

**Etablierung und Weiterentwicklung einer Methode zur
hochauflösenden Untersuchung des Phosphorylierungszustandes
der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1 und ERK2**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Inga Kraus
aus Marl

April 2016

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Labor für Molekulare Neurobiologie der Universität Duisburg-Essen, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, LVR-Klinikum, durchgeführt.

Die zugrunde liegenden Experimente aus der Pilot-Studie mit humanen PBMCs wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Markus Otto am Universitätsklinikum Ulm durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jens Wiltfang

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof.'in Dr. Perihan Nalbant

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2016

Abkürzungsverzeichnis

% C	Anteil von Bisacrylamid an der Gesamtmenge des Acrylamidmonomers
% CV	prozentualer Variationskoeffizient
% T	Konzentration der Gesamtacrylamidmonomere
1D	1-dimensional
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer Demenz
AK	Antikörper
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANOVA	Varianzanalyse, <i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve, <i>area under the curve</i>
BCA	Bicinchoninsäure
Bicine	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-glycin
BK	Bradykinin
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat
CIEF	isoelektrische Kapillar-Fokussierung, <i>capillary isoelectric focusing</i>
CSF	cerebrospinale Flüssigkeit
H ₂ O	Reinstwasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermalen Wachstumsfaktor, <i>epidermal growth factor</i>
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase, <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FCS	Fötales Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
g	Erdbeschleunigung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase, <i>horseradish peroxidase</i>

IgG	Immunglobulin G
LDH	Lactatdehydrogenase
MCI	Leichte kognitive Störungen, <i>mild cognitive impairment</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEK	MAP/ERK Kinase
min	Minuten
MW	Mittelwert
ND	Nicht-demente Kontrolle
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese, <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBMC	mononukleäre Zelle des peripheren Blutes, <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, <i>phosphate-buffered saline</i>
PBS-T	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
pI	Isoelektrischer Punkt
p-ERK1/2	Monophosphoryliertes ERK1 und ERK2
pp-ERK1/2	Diphosphoryliertes ERK1 und ERK2
pT-ERK1/2	Threonin-monophosphoryliertes ERK1 und ERK2
pY-ERK1/2	Tyrosin-monophosphoryliertes ERK1 und ERK2
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, <i>reactive oxygen species</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung, <i>standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SOD1	Cu/Zn-Superoxiddismutase
TEMED	N,N,N,N'-tetramethylethylendiamin
v/v	Anteil Volumen pro Volumen (Volumen der Substanz in ml in 100 ml Lösung)
w/v	Anteil Gewicht pro Volumen (Masse der Substanz in g in 100 ml Lösung)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivierung der ERK1/2 MAP Kinasen.....	14
Abbildung 2: Funktionsweise des CIEF-Immunoassays.....	16
Abbildung 3: Darstellung der zeitabhängigen Aktivierung von ERK1/2 im Western Blot.....	42
Abbildung 4: schematischer Ablauf zur automatisierten Berechnung eines Signal-pI-Wertes mit dem CIEF-Immunoassay.....	44
Abbildung 5: Identifizierung von unphosphorylierten, mono- und diphosphorylierten ERK1- und ERK2-Isoformen.....	46
Abbildung 6: Test verschiedener Lysepuffer-Systeme im Western Blot.....	47
Abbildung 7: Vergleich von unterschiedlichen Lysepuffern im CIEF-Immunoassay.....	49
Abbildung 8: Nachweis des Einflusses von Reduktionsmitteln auf die ERK1/2-Detektion im CIEF-Immunoassay.....	51
Abbildung 9: Auftreten von mono- und diphosphoryliertem ERK1 und ERK2 in PMA-aktivierten THP-1 Zellen.....	53
Abbildung 10: Auflösung der monophosphorylierten ERK1- und ERK2-Doppelpeaks mit verschiedenen anti-phospho-ERK1/2-Antikörpern.....	55
Abbildung 11: Kompetitive Blockierung der spezifischen Antikörperbindung mit synthetischen Peptiden.....	58
Abbildung 12: Vergleich der ERK1/2-Aktivierung in unbehandelten und stimulierten PBMCs im CIEF-Immunoassay.....	60
Abbildung 13: Zeitverlauf von BK-aktivierten SH-SY5Y-Zellen mit zusätzlicher Differenzierung von insgesamt 6 phospho-Isoformen.....	63
Abbildung 14: Kinetik der ERK1/2-Aktivierung in MCP-1-stimulierten THP-1-Zellen mit Differenzierung der monophosphorylierten Isoformen.....	65

Abbildung 15: Zeitliche Aktivierung von NMDA-stimulierten PBMCs mit zusätzlicher Differenzierung der monophosphorylierten ERK1/2-Isoformen.	66
Abbildung 16: Elektropherogramm zur Verdeutlichung der Signalausprägung und repräsentative Kinetik der Phosphorylierung innerhalb der Pilot-Studie.	69
Abbildung 17: Vergleich des zeitabhängigen Auftretens der phospho-Isoformen von ERK1 und ERK2 in den untersuchten diagnostischen Gruppen.	70
Abbildung 18: Vergleichende Analyse zur zeitabhängigen Phosphorylierung von ERK1 in biologischen Proben im Rahmen einer Pilot-Studie.	73
Abbildung 19: hypothetischer Verlauf des NMDA-stimulierten Auftretens von pp-ERK1 in humanen PBMCs.	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ansatz für 2 Mini-Polyacrylamidgele	27
Tabelle 2: verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immundetektion von Western Blots.	29
Tabelle 3: verwendete Primär- und Sekundärantikörper für den CIEF-Immunoassay	32
Tabelle 4: Berechnung der Intraassayvarianz aus $n = 24$ Replikaten bei THP-1-Zellen.....	59
Tabelle 5: Berechnung der Intraassayvarianz aus $n = 24$ Replikaten bei PBMCs.	60
Tabelle 6: Berechnung der Interassayvarianz aus $n = 5$ Wiederholungen bei PBMCs.	61

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	11
1.1	Die extrazellulär regulierten Proteinkinasen ERK1 und ERK2.....	11
1.2	Die ERK1/2-Signalkaskade bei neurodegenerativen Erkrankungen.....	11
1.3	Aktivierung von ERK1/2.....	13
1.4	Monophosphorylierte Formen von ERK1 und ERK2	15
1.5	Detektion der monophosphorylierten Isoformen von ERK1 und ERK2 mit dem CIEF-Immunoassay.....	15
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Materialien.....	19
2.1.1	Verbrauchsmaterial.....	19
2.1.2	Chemikalien	19
2.1.3	Standards und Peptide	22
2.1.4	Antikörper.....	22
2.1.5	Enzyme und Kits	23
2.1.6	Zell-Linien und biologische Proben.....	24
2.1.7	Geräte.....	24
2.1.8	Software.....	25
2.2	Proteinbiochemische Methoden	25
2.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay	25
2.2.2	Natriumdodecylsulfat -Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 26	
2.2.3	Proteintransfer (Western Blot).....	28
2.2.4	Immundetektion	28
2.2.5	Isoelektrische Kapillar-Fokussierung mit nachfolgendem immunologischen Nachweis (CIEF-Immunoassay).....	30

2.2.6	Kompetitive Blockierung mit synthetischen Peptiden zur Identifikation von Threonin- und Tyrosin-monophosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2 (pT- und pY-ERK1/2)	33
2.3	Zellkultur.....	34
2.3.1	Kultivierung von SH-SY5Y-Zellen	34
2.3.2	Kultivierung von THP-1-Zellen	34
2.3.3	Isolierung und Kultivierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs)	35
2.4	Zellstimulation und Lyse	36
2.4.1	Stimulation und Lyse von SH-SY5Y-Zellen.....	37
2.4.2	Stimulation und Lyse von THP-1-Zellen und PBMCs.....	38
2.4.3	Alternative Lyse von THP-1-Zellen mit einem Bicine/CHAPS-Puffer und einem 2-Fractionen-Lyse-System (NE-PER-Kit)	39
2.5	Statistische Analyse	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Detektion von ERK1/2 und phospho-ERK1/2 mittels Western Blot	41
3.2	ERK1/2-Detektion mit dem CIEF-Immunoassay.....	42
3.2.1	Ablauf der Signaldetektion und pI-Berechnung im CIEF-Immunoassay	43
3.2.2	ERK1- und ERK2-Peak-Identifizierung im CIEF-Immunoassay	44
3.3	Auswahl eines geeigneten Lysepuffers	46
3.3.1	Vergleich der Lysepuffer im Western Blot	47
3.3.2	Vergleich der Lysepuffer mit dem CIEF-Immunoassay.....	48
3.3.3	Einfluss des Reduktionsmittels Dithiothreitol auf die ERK1/2-Detektion im CIEF-Immunoassay	50
3.4	Detektion verschiedener phospho-Isoformen von ERK1 und ERK2 mittels CIEF-Immunoassay.....	52
3.4.1	Selektive Immundetektion der monophosphorylierten Teilsignale von ERK1 und ERK2	53

3.5	Eindeutige Identifizierung von pT- und pY-monophosphorylierten ERK1/2-Isoformen durch kompetitive Blockierung.....	55
3.6	Intra- und Interassayvarianz im CIEF-Immunoassay.....	59
3.7	Zeitabhängiges Auftreten von pT- und pY-ERK1/2-Isoformen in verschiedenen Zellen	62
3.7.1	Stimulation von SH-SY5Y-Zellen mit Bradykinin.....	62
3.7.2	Stimulation von THP-1-Zellen mit MCP-1	63
3.7.3	Stimulation von humanen PBMCs mit NMDA	65
3.8	Pilot-Studie zur Kinetik der ERK1/2-Phosphorylierung in PBMCS.....	66
3.8.1	Beschreibung der Daten aus der klinischen Kohorte und Vergleich mit den Daten aus den Vorversuchen.....	67
3.8.2	Vergleich des zeitlichen Verlaufs der ERK1- und ERK2-Phosphorylierung in den untersuchten diagnostischen Gruppen	69
3.8.3	Statistische Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung durch definierte Parameter	71
4	Diskussion.....	74
4.1	Optimierung der Analysebedingungen für ERK1 und ERK2 MAP Kinasen für den CIEF-Immunoassay.....	75
4.2	Eindeutige Identifizierung von pT- und pY-ERK1/2 durch kompetitive Blockierung	78
4.3	Zeitabhängiges Auftreten von pT- und pY-ERK1/2 in verschiedenen Zelltypen nach unterschiedlichen Stimuli	80
4.4	Pilot-Studie zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung von ERK1/2 in PBMCs von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen	84
5	Zusammenfassung	91
6	Ausblick.....	93
7	Literaturverzeichnis.....	94
8	Publikationen	99

1 Einleitung

1.1 Die extrazellulär regulierten Proteinkinasen ERK1 und ERK2

Die durch extrazelluläre Signale regulierten Proteinkinasen ERK1 und ERK2 sind Mitglieder der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP Kinasen). Zur Familie der MAP Kinasen bei Säugetieren gehören neben der Gruppe der ERK-MAP Kinasen noch die p38-MAP Kinasen und die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK, auch Stress-aktivierte Proteinkinase oder SAPK). Während ERK1 und ERK2 hauptsächlich durch Faktoren des zellulären Wachstums oder der Differenzierung aktiviert werden, unterliegen p38 und JNK einer Aktivierung durch proinflammatorische Cytokine und Umwelteinflüsse (Cobb und Goldsmith, 1995; Cheung und Slack, 2004; Roskoski, 2012).

ERK1 und ERK2 werden in der Literatur häufig unter dem Begriff „ERK1/2“ zusammengefasst. Es handelt sich um zwei eng verwandte Kinasen mit einer Sequenzhomologie von 84 %, die allerdings auf verschiedenen Chromosomen codiert sind (Li *et al.*, 1994; Ramos, 2008). ERK1, auch p44 MAPK genannt, ist ein Protein mit einer molekularen Masse von 44 kDa, und ERK2, auch p42 MAPK, hat eine molekulare Masse von 42 kDa. Beide zeigen eine hochkonservierte Primärstruktur, allerdings ist nur wenig über ihre Subtyp-spezifischen Unterschiede hinsichtlich ihrer physiologischen Funktion bekannt.

Die ERK1/2 MAP Kinasen sind in die Regulation von diversen zellulären Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Zelladhäsion, Ablauf des Zellzyklus, Überleben und Apoptose involviert (Cobb und Goldsmith, 1995; Wolf und Seger, 2002; Cheung und Slack, 2004; Ramos, 2008; Roskoski, 2012). Im zentralen Nervensystem spielt die ERK1/2-Signalkaskade eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität, der Langzeit-Potenzierung und –Depression sowie dem Zellüberleben (Grewal *et al.*, 1999; Adams *et al.*, 2000; Sweatt, 2001).

1.2 Die ERK1/2-Signalkaskade bei neurodegenerativen Erkrankungen

Eine Dysregulation der ERK1/2-Signalkaskade wurde mit verschiedenen Arten von Krebs, aber auch mit neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer-Demenz

(AD), Parkinson-Krankheit (PD) und Amyotropher Lateralsklerose (ALS), in Verbindung gebracht (Kim und Choi, 2010; Deschenes-Simard *et al.*, 2014).

Die Alzheimer-Demenz ist eine neurodegenerative Erkrankung, welche klinisch durch eine Dysfunktion von Kognition und Gedächtnis charakterisiert ist. Sie zeichnet sich pathophysiologisch durch die Bildung von extrazellulären amyloiden Plaques und intrazellulären neurofibrillären Bündeln, bestehend aus dem hyperphosphorylierten Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau, aus. Die ERK1/2-Signalkaskade scheint dabei sowohl an der Sekretion des löslichen Amyloid-Vorläufer-Proteins (Desdouts-Magnen *et al.*, 1998), sowie an der Hyperphosphorylierung von Tau beteiligt zu sein (Kim und Choi, 2010). Des Weiteren ist eine Kollokalisierung von phosphorylierten Formen von ERK1/2 und den hierarchisch übergeordneten Kinasen MEK1/2 mit frühen pathologischen neurofibrillären Veränderungen in humanen Gehirnen beschrieben worden (Perry *et al.*, 1999; Pei *et al.*, 2002). Im Rahmen von Untersuchungen zu möglichen Biomarkern der Alzheimer-Krankheit konnte eine erhöhte Konzentration von löslichem ERK1/2-Protein in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) von Patienten mit AD beobachtet werden (Spitzer *et al.*, 2011). In kultivierten Haut-Fibroblasten scheint eine verlängerte ERK-Phosphorylierung nach Stimulation mit Bradykinin bei Patienten mit AD vorzuliegen, was eine Dysregulation von ERK1/2 nicht nur im zentralen Nervensystem, sondern auch in der Peripherie vermuten lässt (Zhao *et al.*, 2002).

Bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) handelt es sich um eine progressive neurodegenerative Erkrankung, welche pathophysiologisch durch Muskelatrophie und Paralyse charakterisiert wird und letztlich zum Tod führt. Die genauen Ursachen der Erkrankung sind bis heute unklar, neben den vorherrschenden sporadischen Fällen gibt es aber einige wenige familiäre Fälle, welche z.B. auf eine vererbte Mutation im Gen der Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD1) zurückzuführen sind (Kim und Choi, 2010). In einem transgenen Mausmodell mit einer Mutation im Gen für SOD1 konnte vermehrt phospho-ERK1/2 im Hippocampus und Cerebellum nachgewiesen werden, was auf eine mögliche Rolle von phospho-ERK1/2 in der abnormal veränderten Kognition und Motorfunktion bei ALS schließen lässt (Chung *et al.*, 2005).

Es wird vermutet, dass sowohl die Alzheimer-Demenz als auch die Amyotrophe Lateralsklerose einhergehen mit einer durch Glutamat vermittelten Exzitotoxizität am

N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor von Neuronen und damit verbundenem oxidativen Stress (Kornhuber und Weller, 1997; Boutahar *et al.*, 2008). In NMDA-stimulierten kortikalen Neuronen konnte eine starke und anhaltende ERK1/2-Phosphorylierung beobachtet werden, welche, abhängig von der Stärke und Dauer des Stimulus, vermutlich zur Apoptose der Zellen führte (Boutahar *et al.*, 2008).

Auch auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) befinden sich funktionelle NMDA-Kanäle (Lombardi *et al.*, 2001) und es wird vermutet, dass sie einem gemeinsamen Regulationsmechanismus mit den neuronalen NMDA-Kanälen unterliegen (Hinoi *et al.*, 2004). Demzufolge könnten auch in Zellen aus der Peripherie krankheitsspezifische Veränderungen in der ERK1/2-Signalkaskade vorliegen. Diese könnten somit einen möglichen Biomarker für die Frühdiagnostik von AD und ALS darstellen, sowie einen potenziellen Ansatzpunkt, um die Hintergründe der jeweiligen Erkrankung näher zu untersuchen und mögliche therapeutische Strategien zu identifizieren.

1.3 Aktivierung von ERK1/2

Eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli inklusive Hormone und Wachstumsfaktoren kann zur Aktivierung von ERK1/2 führen. Eine unphysiologische ERK1/2-Phosphorylierung kann unter anderem durch Phorbolester erreicht werden (Hill und Treisman, 1995). Unter pathophysiologischen Bedingungen wie Trauma, Hirnschlag, Schmerz, Ischämie und Asthma können verschiedene MAP Kinasen auch über den potenten inflammatorischen Mediator Bradykinin (BK) aktiviert werden, welcher sowohl von Zellen im zentralen Nervensystem als auch von peripheren Zellen produziert wird (Ellis *et al.*, 1989; Kamiya *et al.*, 1993; Regoli *et al.*, 1993; Bockmann und Paegelow, 2000). Eine Veränderung der Aktivierbarkeit der ERK1/2 MAP Kinasen nach Zugabe von Bradykinin konnte bereits in Fibroblasten von Patienten mit Alzheimer-Demenz gezeigt werden (Zhao *et al.*, 2002). Auch das Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) aktiviert verschiedene MAP Kinasen (Dubois *et al.*, 1996). Es gehört zu einer großen Familie von chemotaktischen Cytokinen und ist in die Leukozytenmigration involviert, welche ein essentieller Prozess für die Rekrutierung dieser Zellpopulationen zu spezifischen Orten der Inflammation ist (Jimenez-Sainz *et al.*, 2003). Wie bereits in Abschnitt 1.2 beschrieben, besitzen auch PBMCs funktionelle NMDA-Kanäle, welche vermutlich analog zu den NMDA-Kanälen

neuronaler Zellen reguliert werden. Sie sind sowohl an der Regulation der intrazellulären Calcium-Konzentration beteiligt, als auch an der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies, welche den zellulären oxidativen Stress erhöhen (Tuneva *et al.*, 2003). Diese Kanäle könnten in Verbindung mit der durch Glutamat vermittelten Exzitotoxizität, wie sie zum Beispiel bei AD und ALS vermutet wird, zu einer veränderten ERK1/2-Aktivierung führen (Kornhuber und Weller, 1997), was bereits in NMDA-stimulierten kortikalen Neuronen grundlegend gezeigt werden konnte (Boutahar *et al.*, 2008).

Die Bindung eines Liganden, wie beispielsweise des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), an bestimmte membranständige Rezeptoren führt zur Aktivierung der kleinen GTPase Ras, welche ihrerseits Raf zur Membran rekrutiert und dort aktiviert. Raf wiederum phosphoryliert die MAP/ERK Kinase (MEK1/2), welche im Anschluss ERK aktiviert (Wolf und Seger, 2002; Ramos, 2008). Die ERK1/2-Aktivierung durch die hierarchisch übergeordneten Kinasen MEK1/2 erfolgt dabei über eine duale Phosphorylierung an einem konservierten Threonin-Glutamat-Tyrosin (TEY)-Motiv in der Aktivierungsschleife (Thr 202 und Tyr 204 in humanem ERK1, Thr 185 und Tyr 187 in humanem ERK2) (Abbildung 1) (Payne *et al.*, 1991; Cobb und Goldsmith, 1995).

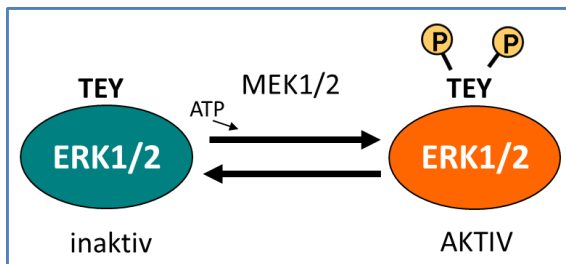


Abbildung 1: Aktivierung der ERK1/2 MAP Kinasen.

Die Aktivierung erfolgt durch eine duale Phosphorylierung am Threonin und Tyrosin des konservierten TEY-Motivs in der Aktivierungsschleife durch die hierarchisch übergeordneten Kinasen MEK1/2.

Während eine Phosphorylierung an beiden Aminosäuren, Threonin und Tyrosin, für die volle Enzymaktivität benötigt wird, können auf diesem Wege auch monophosphorylierte Formen von ERK1 und ERK2 entstehen, da die Phosphorylierung durch MEK1/2 durch einen nicht-prozessiven, distributiven Mechanismus erfolgt (Burack und Sturgill, 1997; Ferrell und Bhatt, 1997).

1.4 Monophosphorylierte Formen von ERK1 und ERK2

Monophosphorylierte Formen der ERK1/2 MAP Kinasen können nicht nur durch eine einfache Phosphorylierung durch MEK1/2 entstehen (siehe Abschnitt 1.3), sondern auch durch die partielle Dephosphorylierung der vollständig aktivierten, doppelt-phosphorylierten ERK1/2-Isoformen durch Phosphatasen. Dazu zählen verschiedene dualspezifische Threonin/Tyrosin-Phosphatasen, Serin/Threonin- oder Tyrosin-spezifische Phosphatasen (Alessi *et al.*, 1995; Saxena *et al.*, 1999; Sohaskey und Ferrell, 1999; Zhou *et al.*, 2002). Auf diesen beiden Wegen können sowohl Threonin-monophosphorylierte Isoformen (pT-ERK1, pT-ERK2) als auch Tyrosin-monophosphorylierte Varianten (pY-ERK1, pY-ERK2) von ERK1 und ERK2 entstehen. Beide Formen von monophosphoryliertem ERK1 und ERK2 sind in lebenden Zellen nachzuweisen, zusätzlich zu den unphosphorylierten und diphosphorylierten Varianten, weshalb vermutet wird, dass sie eine spezifische biologische Funktion besitzen könnten (Yao *et al.*, 2000; Cha und Shapiro, 2001). Die monophosphorylierten Formen von ERK2 besitzen ebenfalls eine nennenswerte Kinaseaktivität *in vitro* in Anwesenheit von 1 mM ATP (Zhou und Zhang, 2002), was im Bereich der physiologischen intrazellulären ATP-Konzentration in Säugerzellen liegt (Gribble *et al.*, 2000). Die katalytische Effizienz der Threonin- und Tyrosin-monophosphorylierten Isoformen von ERK2 ist dabei 2-3 mal höher als die der unphosphorylierten Variante und lediglich um den Faktor 1-2 niedriger als die der vollständig aktivierten doppelt-phosphorylierten Isoform (Zhou und Zhang, 2002). Deshalb wird vermutet, dass die monophosphorylierten Formen von ERK2 möglicherweise intermediäre Aktivierungsstadien repräsentieren könnten, welche eine eindeutige Funktion *in vivo* besitzen könnten (Zhou und Zhang, 2002). Es wurde berichtet, dass Tyrosin-monophosphoryliertes ERK2 vorübergehend mit dem Golgi-Apparat (Komplex) in HELA Zellen während der G2- und M-Phase des Zellzyklus assoziiert, was eine Rolle in der Regulation der Golgi-Struktur andeuten könnte (Cha und Shapiro, 2001).

1.5 Detektion der monophosphorylierten Isoformen von ERK1 und ERK2 mit dem CIEF-Immunoassay

Die hochauflösende isoelektrische Fokussierung in Mikrokapillaren mit immunologischem Nachweis und Chemilumineszenz-Detektion wurde erstmals im

Jahre 2006 als eine neue Technologie vorgestellt, die eine Trennung und hoch-sensitive immunologische Detektion von unphosphorylierten, monophosphorylierten und diphosphorylierten ERK1/2-Isoformen erlaubt (O'Neill *et al.*, 2006). Durch die isoelektrische Fokussierung der Proben in den Mikrokapillaren und eine nachfolgende kovalente Bindung der Proteine an die Kapillareninnenwand, kann der folgende Immunnachweis automatisiert und in derselben Kapillare erfolgen (Abbildung 2). Auf diese Weise werden nur sehr geringe Probenvolumina benötigt (ca. 400 nl) und die Technologie ermöglicht einen hohen Probendurchsatz, da bis zu 96 Kapillaren in einem Lauf verarbeitet werden können. Der Immunnachweis erfolgt analog zu einem Western Blot-Verfahren mit spezifischen primären Antikörpern gegen das zu untersuchende Protein, Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern und einem Chemilumineszenzsubstrat. Die Signale werden, ebenfalls automatisiert, von einer CCD-Kamera nach verschiedenen Belichtungszeiten aufgenommen und zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt. Durch die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte der unphosphorylierten, monophosphorylierten und diphosphorylierten ERK1/2-Isoformen kann eine semi-quantitative Analyse bereits bei Verwendung eines einzigen pan-spezifischen anti-ERK1/2-Antikörpers erfolgen.

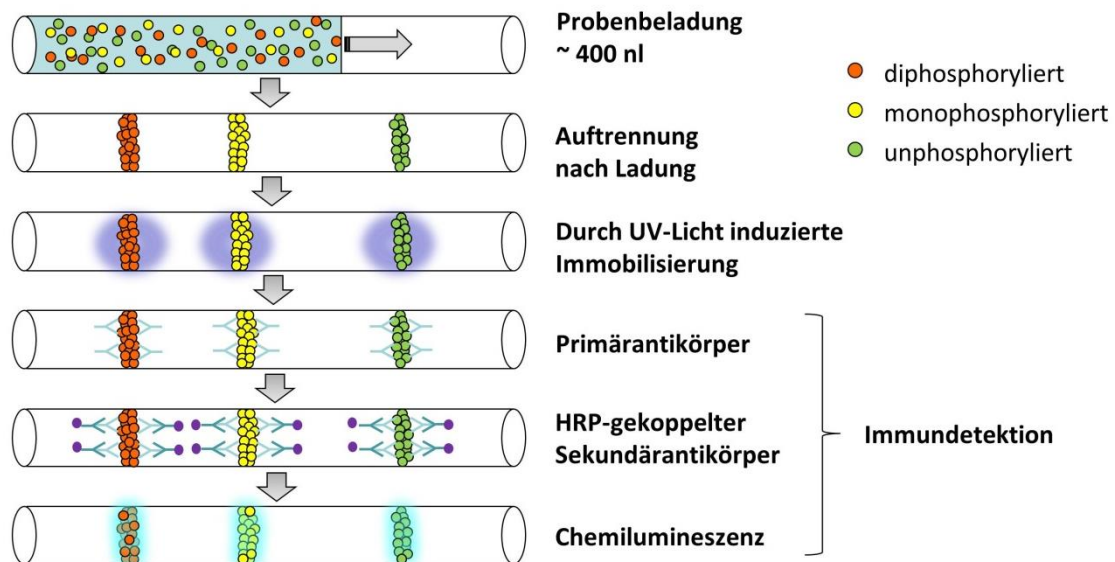


Abbildung 2: Funktionsweise des CIEF-Immunoassays.

Die zu untersuchende Probe wird mit einer Matrix gemischt und in die Mikrokapillare eingesogen. Durch Anlegen einer Spannung bildet sich ein mobiler pH-Gradient aus und die Proteine in der Probe werden isoelektrisch fokussiert. Eine nachfolgende Bestrahlung mit UV-Licht immobilisiert die Proteine, indem sie kovalent an die Kapillareninnenwand gebunden werden. Die Immundetektion mit einem spezifischen Primärantikörper, Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper und einem Chemilumineszenzsubstrat erfolgt im Anschluss automatisiert in derselben Kapillare (verändert nach O'Neill *et al.*, 2006).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel des ersten Projektteils war die Etablierung und Weiterentwicklung eines geeigneten Verfahrens zur sensitiven und hochauflösenden Analyse des ERK1/2-Phosphorylierungszustandes in experimentellen Modellen. Aufgrund der hohen Sensitivität und der Möglichkeit zur semi-quantitativen Analyse bei Verwendung eines einzigen pan-spezifischen anti-ERK1/2-Antikörpers war der CIEF-Immunoassay für diese Ziele hervorragend geeignet. Zunächst sollten hierfür die Assay-Bedingungen angepasst und optimiert werden, um eine möglichst hohe Signalausbeute bei geringem Hintergrundrauschen zu erreichen. Hierfür sollten unter anderem unterschiedliche Lysepuffer getestet werden, da nicht alle Puffersysteme mit dem CIEF-Immunoassay kompatibel sind. Des Weiteren sollte eine exakte Zuordnung und Identifizierung der beobachteten Signale („Peaks“) mit spezifischen Antikörpern analog zur Originalpublikation von O’Neill *et al.* (2006) für die hier verwendeten Zellen durchgeführt werden. Als Erweiterung des analytischen Spektrums dieser Technologie sollten darüber hinaus, zusätzlich zu den bisher differenzierten und publizierten Signalen für un-, mono- und diphosphoryliertes ERK1 und ERK2, die monophosphorylierten Signale jeweils noch in die Threonin- und Tyrosin-monophosphorylierten Varianten unterschieden werden. Abschließend sollte die technische Varianz des Assays für die etablierten Parameter überprüft werden, um im zweiten Teil der Arbeit die Kinetik der ERK1/2-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung in ausgewählten Zellen näher untersuchen zu können.

Zur Analyse des zeitabhängigen Auftretens der verschiedenen ERK1/2-phospho-Formen nach Gabe eines Stimulus im zweiten Teil der Arbeit sollten unterschiedliche humane Zelllinien wie die neuronale Linie SH-SY5Y oder die monozytäre Linie THP-1, sowie periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) als Modelle verwendet werden. Spezieller Fokus lag hierbei insbesondere auf der zusätzlichen Unterscheidung der Threonin- und Tyrosin-monophosphorylierten Isoformen von ERK1 und ERK2. Zu diesem Zweck sollten verschiedene Stimuli eingesetzt werden, um Unterschiede in der ERK1/2-Phosphorylierung zwischen den einzelnen Zelltypen und eingesetzten Behandlungssubstanzen darstellen zu können sowie einen geeigneten zeitlichen Rahmen für die Untersuchungen zum Aktivierungszustand einzugrenzen. Da ERK1/2 in verschiedene neurodegenerative Krankheiten involviert sind, sollte die etablierte Methode abschließend im Rahmen einer Pilot-Studie an NMDA-stimulierten humanen PBMCs einer klinischen Kohorte angewandt werden.

Hierbei ging es um die Fragestellung, ob in diesen Zellen Veränderungen in der ERK1/2-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung zu beobachten sind, welche möglicherweise im Zusammenhang mit AD oder ALS stehen könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterial

EDTA S-Monovetten, 9 ml K3E	Sarstedt AG, Nümbrecht
Einweg-Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
epT.I.P.S® Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Gewebekulturflaschen, steril, 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturschale, steril, 6 cm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Immobilion®-P Membran, PVDF, 0,45 µm	Merck, Darmstadt
Microplatte, 96well, Polystyren, F-Boden, glasklar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Minisart® Spitzenvorsatzfilter, 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Polypropylen Röhrchen, steril, 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PROTEAN® Filterpapier, extra dick	BioRad, München
Safe-Lock Mikroreaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Suspensionskulturflaschen, steril, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellspachtel, steril, 13 mm Schaberbreite	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.2 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Life Technologies, Darmstadt
-------------------	------------------------------

2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamidfertiglösung (Rotiphorese® Gel 30)	Carl Roth, Karlsruhe
alamarBlue®	Bio-Rad Abd Serotec GmbH, Puchheim
Amersham ECL Prime Blocking Reagent	GE Healthcare, München
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Anisomycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Antibody Diluent	ProteinSimple, Santa Clara, Kalifornien, USA
Aqueous-Inhibitor-Mix	ProteinSimple, Santa Clara, Kalifornien, USA
Bicine (N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-glycin)	Biomol, Hamburg
Biocoll, Dichte 1,077	Biochrom, Berlin
Bradykinin	Calbiochem, Darmstadt
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
CER I-Puffer (Bestandteil des NE-PER-Kits)	Thermo Scientific / Pierce, Bonn
CER II-Puffer (Bestandteil des NE-PER-Kits)	Thermo Scientific / Pierce, Bonn
CHAPS (3-(3-Cholamidopropyl-) dimethylammonio-1-propansulfonat)	Genaxxon BioScience, Ulm
Dimethylsulfoxid (DMSO), Hybri Max®, steril	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	GE Healthcare, München
DMSO-Inhibitor-Mix	ProteinSimple, Santa Clara, Kalifornien, USA

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) + GlutaMAX™	Life Technologies, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fötale Kälberserum (FCS) superior	Biochrom, Berlin
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)-Puffer	Life Technologies, Darmstadt
Glycerin 87 %	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Iodacetamid	GE Healthcare, München
M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent	Thermo Scientific / Pierce, Bonn
Methanol	Avantor (J.T. Baker), Freising
Monocyte Chemotactic Protein-1/MCAF (CCL2), human recombinant (rHuMCP-1)	Biomol, Hamburg
Natriumdodecylsulfat (SDS) ultra pure	Biomol, Hamburg
NER-Puffer (Bestandteil des NE-PER-Kits)	Thermo Scientific / Pierce, Bonn
NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
Plus ONE N,N,N,N-tetramethylethyldiamin (TEMED)	GE Healthcare, München
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Premix G2, pH 5-8 (nested) separation gradient	ProteinSimple, Santa Clara, Kalifornien, USA

Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Life Technologies, Darmstadt
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.3 Standards und Peptide

Magic Mark Protein Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
pI Standard 5.5	ProteinSimple, Santa Clara, Kalifornien, USA
pI Standard Ladder 3	ProteinSimple, Santa Clara, Kalifornien, USA
Precision Plus Protein™ All Blue Standards	BioRad, München
Synthetische ERK1/2-Peptide	Moravian Biotechnology, Brno, Tschechische Republik

2.1.4 Antikörper

Anti-Fibrillarin antibody - Nucleolar Marker (ab5821)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-GAPDH antibody - Loading Control (ab9485)	Abcam, Cambridge, UK
ERK 2 (D-2): sc-1647	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
ERK1 Antibody, Rabbit, #040-475	ProteinSimple, Santa Clara, Kalifornien, USA
ERK1/2 Antibody, Rabbit, #040-474	ProteinSimple, Santa Clara, Kalifornien, USA

Goat Anti-Mouse IgG, H & L Chain Specific, Peroxidase Conjugate, #401253	Calbiochem, Darmstadt
Goat Anti-Rabbit IgG, H & L Chain Specific, Peroxidase Conjugate, #401393	Calbiochem, Darmstadt
Goat-Anti-Mouse Secondary Antibody, HRP-conjugate, #040-655	ProteinSimple, Santa Clara, Kalifornien, USA
Goat-Anti-Rabbit HUX HRP Secondary Antibody, #041-081	ProteinSimple, Santa Clara, Kalifornien, USA
Monoclonal Anti-MAP Kinase, Activated (Diphosphorylated ERK-1&2) antibody produced in mouse, #M8159	Sigma Aldrich, Taufkirchen
p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody, #9102	Cell Signaling Technology/New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
p-ERK1/2 Antibody, Rabbit, #040-477	ProteinSimple, Santa Clara, Kalifornien, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (197G2) Rabbit mAb, #4377	Cell Signaling Technology/New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb, #4370	Cell Signaling Technology/New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

2.1.5 Enzyme und Kits

Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, München
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega, Madison, USA

NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Thermo Scientific / Pierce, Bonn

Pierce™ BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific / Pierce, Bonn

Trypsin/EDTA (0,5 % / 0,2 % w/v) w/o Ca²⁺, Mg²⁺ Biochrom, Berlin

Vi-CELL Single Pak Beckman Coulter, Krefeld

XDR Charge Separation Master Kit for Peggy or NanoPro 1000 ProteinSimple, Santa Clara, Kalifornien, USA

2.1.6 Zell-Linien und biologische Proben

SH-SY5Y-Zellen ECACC/Sigma Aldrich, Taufkirchen

THP-1-Zellen ATCC/LGC Standards GmbH, Wesel

PBMCs aus EDTA-Vollblut, human Biomaterialbankinitiative und gesunde Freiwillige (Essen), Probanden der Pilot-Studie (Ulm)

2.1.7 Geräte

CO₂ Inkubator MCO-20AIC Panasonic, Hamburg

Elektrophoresesystem: Mini-PROTEAN® Tetra-Cell BioRad, München

Infinite® M200 Tecan, Männedorf, Schweiz

Intas Imager Intas, Göttingen

NanoPro™ 1000 ProteinSimple, Santa Clara, Kalifornien, USA

Semi-Dry Western-Blot-Apparatur, TE 77 X GE Healthcare, München

Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Vi-Cell™ XR	Beckman Coulter, Krefeld
Werkbank, Herasafe KS 18	Thermo Fisher, Rockford, USA
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg

2.1.8 Software

Compass	ProteinSimple, Santa Clara, Kalifornien, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Magellan	Tecan, Männedorf, Schweiz
Office 2010	Microsoft, Redmond, USA

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay

Die Proteinkonzentrationen der Zelllysate wurden kolorimetrisch mit Hilfe des BCA-Assays bestimmt (Smith *et al.*, 1985). Dieser basiert auf der quantitativen Reduktion von Cu^{2+} -Ionen durch die Komplexbildung mit Proteinen in alkalischen Lösungen (Biuret-Reaktion). Die dadurch entstehenden einwertigen Cu-Ionen bilden mit zwei BCA-Molekülen einen violetten Farbkomplex, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt. Die photometrisch gemessene Absorption bei dieser Wellenlänge verhält sich dabei proportional zur Proteinkonzentration in der Probe. Reduktionsmittel, wie z.B. Dithiothreitol (DTT), können die Cu^{2+} -Ionen ebenfalls reduzieren. Bei Vorhandensein eines Reduktionsmittels im Lysepuffer ist daher eine Vorbehandlung der Proben mit Iodacetamid notwendig (Hill und Straka, 1988). Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten erfolgte mit Hilfe einer Verdünnungsreihe mit definierten Konzentrationen des gewählten Standardproteins BSA (Rinderserumalbumin). Bei Lysaten ohne Reduktionsmittel wurden 7 μl Zelllysate

mit 49 µl H₂O gemischt. Bei Lysaten mit Reduktionsmittel wurden die 7 µl Lysat zunächst mit 21 µl H₂O gemischt und danach weitere 28 µl einer 20 mg/ml Iodacetamid-Lösung in 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) hinzugegeben. Die Umsetzung des Reduktionsmittels erfolgte im Anschluss für 15 min bei 37 °C. Die Vorverdünnungen wurden bei der späteren Bestimmung der Proteinkonzentration berücksichtigt. Da die BSA-Standardreihen ebenfalls mit dem jeweiligen Lysepuffer angesetzt worden waren, wurden diese äquivalent zu den Proben entweder mit H₂O oder Iodacetamid 1:1 gemischt. Die Standardreihe wurde mit 9 definierten Konzentrationen BSA erstellt. Anschließend wurden von allen Ansätzen je 20 µl pro well in eine 96-well-Platte pipettiert. Dabei wurden von den unbekanntenen Proben Doppelbestimmungen und von der BSA-Standardreihe je Dreifachbestimmungen angelegt. Im nächsten Schritt wurden 200 µl Arbeitslösung pro well zugefügt (BCA-Lösung gemischt mit 4 % Kupfer(II)Sulfatlösung 50:1), die Platte 30 min bei 37 °C inkubiert und abschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen (Infinite® M200). Die Berechnung der Proteinkonzentrationen in den unbekanntenen Lysaten erfolgte mit der Magellan-Software mittels quadratischer Regressionsanalyse der BSA-Standardreihe unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors.

2.2.2 Natriumdodecylsulfat -Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wandern im elektrischen Feld aufgrund ihrer positiven und negativen Ladungen, wobei sowohl ihre Nettoladung, Größe und Struktur einen Einfluss darauf haben. Für eine Auftrennung nach Proteingröße wird die Eigenladung der Proteine durch Zugabe bzw. Bindung des negativ geladenen denaturierenden Detergenz SDS an das Protein überlagert. Dadurch entsteht eine gleichmäßige negative Ladungsverteilung und das Protein wandert im elektrischen Feld zur Anode.

Für die hier eingesetzte diskontinuierliche SDS-PAGE in Gegenwart von Glycin und Tris (Laemmli, 1970) wurden 0,75 mm dicke Gele und das Elektrophoresesystem Mini-PROTEAN® Tetra Cell verwendet. Zunächst wurde eine 12 %ige Trenngellösung hergestellt (Tabelle 1), in eine Gelkammer gegossen und mit 70 %igem Isopropanol überschichtet.

Tabelle 1: Ansatz für 2 Mini-Polyacrylamidgele

Stocklösungen	Trenngel, 12 % T (10 ml)	Sammelgel, 4 % T (5 ml)
4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	2,5 ml	-
4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)	-	1,25 ml
Acrylamidfertiglösung 30 % T / 2,6 % C (Rotiphoerese® Gel 30)	4 ml	667 µl
10 % SDS	100 µl	50 µl
H ₂ O	3,35 ml	2,973 ml
10 % APS	40 µl	40 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen, die Gelkammer mit der 4 %igen Sammelgel-Lösung aufgefüllt und luftblasenfrei ein Kamm zur Ausformung der Probenschächte eingesetzt. Nach beendeter Polymerisation wurden die Gele in eine Gelkammer eingesetzt. Sowohl die Innen- als auch die Außenkammer wurden mit Lämmli-Laufpuffer gefüllt und die Kämmen unter Puffer entfernt. Zur Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE wurden die Zelllysate mit zweifach konzentriertem Lämmli-Probenpuffer und H₂O so gemischt, dass die einzelnen Ansätze jeweils 100 ng/µl Protein enthielten. Nachdem diese Ansätze 5 min bei 95 °C gekocht worden waren, konnten sie anschließend zu je 5 µl pro Spur in die Probenschächte pipettiert werden (ergab 500 ng Protein pro Spur). Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V für etwa 1,5 h.

Lämmli-Laufpuffer	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS
2x Lämmli-Probenpuffer	0,125 M Tris-HCl, pH 6,8 4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerol 200 mM DTT 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

2.2.3 Proteintransfer (Western Blot)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine erfolgt ihr ortstgetreuer Transfer aus dem SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran. Dafür wird ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, in welchem die Proteine Richtung Anode wandern und aufgrund von hydrophoben und polaren Wechselwirkungen an die PVDF-Membranoberfläche immobilisiert und damit für die in 2.2.4 folgende Immundetektion vorbereitet werden.

Hierfür wurde ein Tris-Glycin-Blotpuffer (Towbin *et al.*, 1979) und das Semi-Dry-Blotverfahren verwendet. Die PVDF-Membran wurde zunächst in Methanol aktiviert, kurz in H₂O gewaschen und für einige Minuten in Blotpuffer äquilibriert. Am SDS-Gel wurde das Sammelgel entfernt und anschließend das Trenngel, sowie auch die benötigten Filterpapiere, ebenfalls für einige Minuten in Blotpuffer äquilibriert. Auf den Semi-Dry-Blotter wurden zunächst zwei Lagen Filterpapier gefolgt von der PVDF-Membran aufgelegt. Darauf folgte luftblasenfrei das vorbereitete Trenngel, gefolgt von zwei weiteren Lagen Filterpapier. Der Protein-Transfer erfolgte bei konstant 47 mA pro Gel (1 mA/cm²) für 1 h.

Towbin-Blotpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3
	192 mM Glycin
	20 % (v/v) Methanol

2.2.4 Immundetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran können die Zielproteine mit Hilfe von ausgewählten Antikörpern nachgewiesen werden. Für die Immundetektion wird ein spezifischer Primärantikörper eingesetzt, der an ein bestimmtes Epitop des zu analysierenden Proteins oder Peptids bindet. Ein gegen den verwendeten primären Antikörper gerichteter Sekundärantikörper, der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist, ermöglicht einen chemilumineszenten Nachweis nach Zugabe des Substrats Luminol.

Im Vorfeld wurde die Membran 1 h bei RT in der jeweiligen Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die PVDF-Membran zu minimieren. Im Anschluss wurde der gewählte Primärantikörper, verdünnt in

derselben Blockierungslösung, auf die Blotmembran gegeben und diese über Nacht bei 4 °C inkubiert (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immundetektion von Western Blots.

	Antikörper	Verdünnung	Blockierungs- lösung	Inkubations- zeit
Primär-AK	p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody, CS #9102	1:1.000 in Blockierungs- lösung	2 % ECL	Über Nacht, 4 °C
	Monoclonal Anti-MAP Kinase, Activated (Diphosphorylated ERK-1&2) antibody produced in mouse, Sigma #M8159	1:2.000 in Blockierungs- lösung	Prime Blocking Reagent in PBS-T, 1 h, RT	Über Nacht, 4 °C
	Anti-Fibrillarin antibody - Nucleolar Marker, Abcam (ab5821)	1:1.000 in Blockierungs- lösung		Über Nacht, 4 °C
	Anti-GAPDH antibody - Loading Control, Abcam (ab9485)	1:3.000 in Blockierungs- lösung	3 % BSA in PBS-T, 1 h, RT	Über Nacht, 4 °C
Sekundär-AK	Goat Anti-Rabbit IgG, H & L Chain Specific, Peroxidase Conjugate, Calbiochem #401393	1:50.000 in PBS-T	-	1 h, RT
	Goat Anti-Mouse IgG, H & L Chain Specific, Peroxidase Conjugate, Calbiochem #401253	1:15.000 in PBS-T	-	1 h, RT

Am nächsten Tag wurde die Membran erst 3 x 10 min in PBS-T gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit dem passenden Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper in PBS-T inkubiert. Nach weiteren 3 x 10 min Waschen in PBS-T konnte die Detektion durchgeführt werden. Dafür wurden zu gleichen Teilen Luminol- und Peroxidlösung gemischt und 5 min auf der Membran

belassen. Die antikörpergebundene Peroxidase setzte dabei das Luminol um, wodurch ein chemilumineszentes Signal entstand, was mit dem Intas-Blot-Imager bei einer Belichtungszeit von max. 15 x 1 min detektiert wurde.

PBS-T 1x PBS
 0,075 % (v/v) Tween-20

2.2.5 Isoelektrische Kapillar-Fokussierung mit nachfolgendem immunologischen Nachweis (CIEF-Immunoassay)

Der CIEF-Immunoassay wurde auf der NanoPro™-1000-Plattform nach Herstellerangaben durchgeführt. Diese Technologie macht sich die amphoteren Eigenschaften von Proteinen zu Nutze, die in einem mobilen pH-Gradienten genau bis zu der Stelle wandern, an der ihre jeweilige Nettoladung gleich null ist (isoelektrischer Punkt, pI). Nach erfolgter Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung in Mikrokapillaren werden die Proteine im NanoPro-Gerät durch eine photochemische Reaktion kovalent an die Innenseite der Kapillaren gebunden und dadurch immobilisiert. Nachfolgend werden die Proteine mit einem antikörperbasierten Verfahren detektiert, welches analog zum oben beschriebenen immunologischen Nachweis von auf PVDF-Membranen geblotteten Proteinen verläuft (siehe Abschnitt 2.2.4). Dazu werden spezifische primäre Antikörper gegen das zu untersuchende Protein, Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper und ein Chemilumineszenzsubstrat verwendet. Isoelektrische Fokussierung und immunologischer Nachweis laufen automatisiert auf der NanoPro-Plattform in Mikrokapillaren ab, weshalb nur sehr geringe Probenvolumina benötigt werden und des Weiteren bis zu 96 Proben parallel in einem Lauf analysiert werden können (O'Neill *et al.*, 2006).

Alle im Folgenden beschriebenen Schritte wurden gemäß den Herstellerangaben auf Eis durchgeführt. Für die Auftrennung der Proteine in den Zelllysaten wurde ein gebrauchsfertiger Premix mit einem pH-Gradienten von 5-8 gewählt (Premix G2, pH 5-8 (nested)). Diesem Premix wurden zusätzlich noch die fluoreszierende pI Standard Ladder 3 (pI 4,9; 6,0; 6,4; 7,0 und 7,3), sowie ein weiterer fluoreszierender Marker mit pI 5,5 zugesetzt, um bei der Auswertung eine möglichst genaue Zuordnung der pI-Werte der Zielproteine vornehmen zu können. Der Premix mit den

zugesetzten pH-Standards wurde anschließend aufgrund seiner hohen Viskosität 1 min auf einem Vortex-Schüttler gründlich gemischt und danach 3 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert, um die beim Mischen entstandenen Luftblasen zu entfernen. Der fertige Premix wurde im nächsten Schritt in vorgekühlte 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäße zu 22,5 µl vorlegt, sodass er 75 % des Endvolumens einnahm (30 µl). Anschließend wurde 1x DMSO-Inhibitor-Mix zu jedem Mikroreaktionsgefäß hinzugefügt (0,6 µl), um den proteolytischen Verdau zu minimieren. Danach wurde das Zelllysat hinzugegeben, wobei die finale Proteinkonzentration (Gesamtprotein) in jedem Ansatz auf 100 µg/ml eingestellt wurde. Der für die Zelllyse gewählte Lysepuffer (siehe Abschnitt 2.4) wurde abschließend zur Angleichung des Endvolumens (30 µl) jedes Ansatzes verwendet. Die fertiggestellten Proben für den Assay wurden abschließend nochmals 1 min auf einem Vortex-Schüttler gründlich gemischt und dann 3 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert, um die Luftblasen zu entfernen. Diese Ansätze, die gewählten und ggf. vorverdünnten Primär- und Sekundärantikörper, sowie der Luminol/Peroxid XDR-Substrat-Mix (Bestandteil des XDR Charge Separation Master Kits) wurden in einer 384 well-Mikrotiterplatte zu je 10-15 µl vorgelegt, abhängig vom Umfang des Assays. Alle Proben wurden in technischen Duplikaten gemessen. Die Verdünnung der jeweiligen Antikörper mit Antibody Diluent ist Tabelle 3 zu entnehmen. Die Mikrotiterplatte wurde nach dem Auftragen der Proben, Antikörper und des Substrat-Mixes 10 min bei 1.500 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend in das NanoPro™ 1000 Instrument transferiert.

Die einzelnen Schritte des automatisierten CIEF-Immunoassays wurden mit der Compass Software programmiert, die sowohl der Steuerung des NanoPro-Gerätes als auch der Datenauswertung dient. Als erstes wurde das Probengemisch mit den Fluoreszenz-markierten pI-Standards und den Ampholyten des Premixes in die Kapillaren eingesaugt und anschließend die isoelektrische Fokussierung bei 21.000 µW für 40 min durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden die Proteine und pI-Standards an der inneren Kapillarwand in einer photochemischen Reaktion immobilisiert, indem sie für 100 sec mit UV-Licht bestrahlt wurden. Überschüssige Probenlösung wurde durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt (Beladung: 20 sec, Haltezeit: 150 sec), gefolgt von der Inkubation mit dem Primärantikörper für 120 min. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde der HRP-konjugierte Sekundärantikörper für 60 min in der Kapillare inkubiert. Zwei weitere abschließende Waschschriffe wurden gefolgt von der Inkubation mit dem

Luminol/Peroxid-Mix, um chemilumineszente Signale zu erzeugen, welche nach festgelegten Belichtungszeiten automatisiert aufgezeichnet wurden.

Die Bestimmung der fluoreszierenden pI-Standards, sowie die Angleichung von Laufstreckenunterschieden zwischen einzelnen Kapillaren (Peak-Alignment) wurden ebenfalls mit der Compass Software durchgeführt. Basierend auf den pH-Standards erfolgte anschließend die softwaregestützte Berechnung der pI-Werte der Zielsignale und die Quantifizierung der Rohsignale durch Peak-Integration. Zur weiteren Auswertung wurde aus den aufgezeichneten Daten eine Belichtungszeit gewählt, bei der das stärkste Signal noch nicht gesättigt war. Für alle gezeigten ERK-Analysen wurde eine Belichtungszeit von 240 sec verwendet. Die prozentualen Flächeninhalte (AUC) der aufgezeichneten Signale für jede phospho-ERK1- und phospho-ERK2-Isoform wurden in Relation zur Summe der Peakflächen aller ERK1- bzw. ERK2-Signale berechnet, inklusive der unphosphorylierten Varianten. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Peakflächen wurden aus den jeweiligen technischen Duplikaten ermittelt.

Tabelle 3: verwendete Primär- und Sekundärantikörper für den CIEF-Immunoassay

	Antikörper	Verdünnung
Primär-AK	ERK1/2 Antibody, Rabbit, PS #040-474	Gebrauchsfertig
	ERK1 Antibody, Rabbit, PS #040-475	Gebrauchsfertig
	ERK 2 (D-2) #sc-1647	1:30
	p-ERK1/2 Antibody, Rabbit, PS #040-477	Gebrauchsfertig
	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (197G2) Rabbit mAb ,CS #4377	1:50
	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb , CS #4370	1:50
Sekundär-AK	Goat-Anti-Rabbit HUX HRP Secondary Antibody, PS #041-081	1:100
	Goat-Anti-Mouse Secondary Antibody, HRP-conjugate, PS #040-655	1:100

2.2.6 Kompetitive Blockierung mit synthetischen Peptiden zur Identifikation von Threonin- und Tyrosin-monophosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2 (pT- und pY-ERK1/2)

Blockierungsreagenzien wie z.B. synthetische Peptide werden zur Evaluierung der Spezifität von Antikörperreaktionen unter anderem im Western Blot eingesetzt. Die Bindung von Blockierungspeptiden an den Antikörper beruht auf einer Homologie der Aminosäuresequenz des Peptids mit dem Epitop des Zielproteins, welches durch den Antikörper erkannt wird. Eine Vorinkubation des Antikörpers mit dem Peptid führt zur Absättigung der spezifischen Antikörperbindungsstellen, weshalb der auf diese Weise blockierte Antikörper nicht mehr an das Epitop im Zielprotein binden kann.

Für die kompetitive Blockierung wurden Lysate von PBMCs verwendet, welche zuvor mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) behandelt worden waren, um eine möglichst hohe Phosphorylierung zu gewährleisten. Die synthetischen Peptide KTGFL(pT)E(pY)VATR (pp), KTGFL(pT)EYVATR (pT), KTGFL(pT)EYVATR (pY) und KTGFLTEYVATR (unphosphoryliert) wurden freundlicherweise von Dr. Borek Vojtesek (Moravian Biotechnology Ltd) zur Verfügung gestellt. Die Peptide korrespondieren mit dem Bereich der ERK1/2-Aminosäuresequenz, welche das konservierte TEY-Aktivierungsmotiv beinhaltet, und zwar in allen vier möglichen Phosphorylierungszuständen (unphosphoryliert, einfach phosphoryliert an Tyrosin, einfach phosphoryliert an Threonin und doppelt phosphoryliert an Threonin und Tyrosin). Alle hier verwendeten synthetischen Peptide enthielten einen zusätzlichen Lysin-Rest (K) am Aminoterminus, der für chemische Kopplungen in einem anderen Kontext benötigt wurde. Die vier unterschiedlichen Peptide (vorverdünnt in Antibody Diluent) wurden separat mit jedem der drei folgenden anti-phospho-ERK1/2-Antikörper gemischt: #040-477 (ProteinSimple), #4370 (Cell Signaling) und #4377 (Cell Signaling). Der phosphorylierungsinsensitive anti-pan-ERK1/2-Antikörper (PS#040-474) diente dabei als Kontrolle. Von den Antikörpern #4370 und #4377 wurden je 1 µl der Stammlösung mit 44 µl Antibody Diluent und 5 µl der jeweiligen Peptid-Vorverdünnung gemischt (ergab 1:50 Verdünnung der Antikörper). Die Endkonzentrationen der Peptide für diese Blockierungsexperimente lagen bei 10 µg/ml für das pp-, das pT- und das nichtphosphorylierte Peptid und bei 50 µg/ml für das pY-Peptid. Für den anti-phospho-ERK1/2-Antikörper #040-477 und für den anti-pan-ERK-Antikörper wurden 45 µl der gebrauchsfertig gelieferten Antikörperlösungen mit 5 µl der jeweiligen Peptid-Vorverdünnung gemischt. Die

2.3.3 Isolierung und Kultivierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs)

Als mononukleäre Zellen des peripheren Blutes werden die agranulären Zellen der Leukozyten bezeichnet. Bei den isolierten PBMCs handelt es sich um ein Zellgemisch aus T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten. Alle PBMCs besitzen einen runden Zellkern und reagieren auf eine Vielzahl von Signalen. Sie sind von wachsendem Interesse für diagnostische und therapeutische Zwecke bei vielen humanen Erkrankungen, da sie als Bestandteil des Blutes sehr leicht zugänglich sind und aus Vollblut relativ einfach extrahiert werden können (Mandas und Dessi, 2014).

Von allen freiwilligen Spendern von Blutproben, die im Rahmen der Assay-Etablierung verwendet wurden, liegen unterschriebene Einverständniserklärungen vor. Die durchgeführten Experimente und Untersuchungen erfolgten im Rahmen von Biomarkerstudien bzw. der lokalen Biomaterialbankinitiative, die von der Ethik-Kommission der Universität Duisburg-Essen genehmigt worden sind (Ethikvotum vom 06.09.2012, Akz. 12-5160-BO und Amendment vom 26.03.2014, Akz. 12-5160-BO).

Von den Probanden einer kleinen klinischen Kohorte im Rahmen einer Pilot-Studie, welche in Kooperation mit dem Universitätsklinikum Ulm stattfand, wurden ebenfalls die entsprechenden Einverständniserklärungen eingeholt. Die durchgeführten Schritte erfolgten in Übereinstimmung mit dem dortigen Ethikvotum. Die Probanden dieser Studie wurden anhand klinischer und neuropsychologischer Kriterien in vier Gruppen eingeteilt: (1) Patienten mit Alzheimer-Demenz (AD, $n = 5$), (2) Patienten mit leichten kognitiven Einschränkungen (MCI, $n = 3$), (3) Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose (ALS, $n = 4$), (4) nicht-demente Kontrollen (ND, $n = 7$). Alle Experimente zu dieser Studie wurden am Universitätsklinikum Ulm in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Markus Otto durchgeführt.

Das verwendete Vollblut wurde in 4 x 9 ml EDTA-Monovetten gesammelt und anschließend unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur weiterverarbeitet. Das Blut wurde zunächst 1:2 mit Waschpuffer verdünnt. Anschließend wurden 12 ml Biocoll in einem 50 ml-Röhrchen vorgelegt und diese vorsichtig mit 38 ml der Blutverdünnung überschichtet. Es folgte eine Dichtegradientenzentrifugation bei 800 x g für 30 min bei RT mit deaktivierter Bremse (Ausschwingrotor). Anschließend konnten die PBMCs an der Biocoll/PBS-Grenze abgenommen werden. Dabei wurde

die Ausbeute von 2 Gradienten vereint. Die Zellsuspension wurde mit Waschpuffer auf 50 ml aufgefüllt und bei 700 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml Waschpuffer resuspendiert. In ein frisches 50 ml-Röhrchen wurden parallel 10 ml FCS mit Zusatz von EDTA (Endkonzentration 5 mM) vorgelegt, welche anschließend vorsichtig mit der Zellsuspension überschichtet wurden. Es folgte eine weitere Dichtegradientenzentrifugation bei 80 x g für 15 min bei RT, ebenfalls mit deaktivierter Bremse (Ausschwingrotor). Der Überstand wurde verworfen und das am Boden befindliche Zellpellet mit den PBMCs in 40 ml Waschpuffer aufgenommen. Es folgte ein letzter Waschschrift bei 500 x g für 5 min bei RT. Parallel wurden die Zellen gezählt, um abschließend das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen Kultivierungsmedium zu resuspendieren, sodass eine Zellsuspension mit 5 Millionen Zellen pro ml entstand. Die isolierten PBMCs wurden in spezielle Zellkulturflaschen für Suspensionszellen gegeben und stets eine Nacht im Brutschrank inkubiert bevor sie am nächsten Tag für Behandlungen verwendet wurden.

PBMC-Waschpuffer:	1 x PBS 2 mM EDTA
PBMC-Kultivierungsmedium:	RPMI1640-Medium 10 % FCS 10 mM HEPES 100 U/ml Penicillin/Streptomycin

2.4 Zellstimulation und Lyse

Die hier durchgeführten Stimulationsexperimente dienten der Aktivierung der ERK1/2-Kinasen, um den zeitlichen Verlauf des Phosphorylierungszustands zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden ausgewählte Reagenzien zur Stimulation der Zellen eingesetzt. Die nachfolgende Lyse erfolgte unmittelbar nach dem Abstoppen der Stimulation, um den Grad der ERK1/2-Phosphorylierung in den Zellen zu erhalten.

Alle drei Zelltypen wurden mit 200 nM PMA behandelt. Weiterhin wurden die SH-SY5Y-Zellen mit 100 nM Bradykinin (BK) und die THP-1-Zellen mit 100 ng/ml Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) stimuliert. Die PBMCs wurden mit

50 μ M N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) in Kombination mit 10 μ M Glycin behandelt. Alle Substanzen wurden in kleinen Volumina zu den Zellen gegeben ($\leq 1\%$ des Endvolumens), um eine Aktivierung von ERK1/2 durch Verdünnung auszuschließen. Es wurde ein zeitlicher Verlauf der ERK1/2-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung erstellt, indem die Stimulation nach bestimmten Zeitpunkten nach Zugabe des Agens gestoppt wurde. Zu diesem Zweck wurden die Zellen auf Eis platziert, das Medium entfernt und die Lyse eingeleitet. In Abhängigkeit vom untersuchten Zelltyp wurden unterschiedliche Arbeitsprotokolle für die Herstellung der Zelllysate angewendet (s.u.). Grundsätzlich wurden für alle Zellen sämtliche Schritte nach dem Abstoppen der Stimulation auf Eis durchgeführt und es wurden ausschließlich auf 4 °C vorgekühlte Puffer und Gefäße verwendet. Der verwendete Waschpuffer war für alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsprotokolle identisch. Der angegebene Lysepuffer wurde für die Zellen in den Abschnitten 2.4.1 und 2.4.2 verwendet. In Abschnitt 2.4.3 wurden zwei weitere Puffer bzw. Puffersysteme zur Zelllyse eingesetzt.

Waschpuffer:	1 x PBS
	2 mM EDTA
	Vorgekühlt auf 4 °C
Lysepuffer:	M-PER-Reagenz
	1 x DMSO-Inhibitor-Mix
	1 x Aqueous-Inhibitor-Mix
	Vorgekühlt auf 4 °C

2.4.1 Stimulation und Lyse von SH-SY5Y-Zellen

Die SH-SY5Y-Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, ausgesät und für die Versuche verwendet. Nach Zugabe der Behandlungssubstanz ins Medium und der gewählten Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Zellkulturschalen auf Eis platziert und das Medium sofort entfernt. Die Zellen wurden anschließend mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 500 μ l des gekühlten Waschpuffers in die Schale gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber mechanisch vom Untergrund gelöst und die Zellsuspension in ein 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Es wurden erneut 500 μ l Waschpuffer in die Schale gegeben und die

darauffolgenden Schritte wiederholt, um eine möglichst hohe Zellausbeute zu erzielen. Die Zellsuspension wurde nun bei 500 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet möglichst trocken gesaugt. Anschließend wurden 150 µl Lysepuffer hinzugegeben und das Zellpellet auf einem Vortex-Schüttler gelöst. Die Lyse erfolgte für 10 min bei 4 °C auf einem Thermomixer bei 1.000 rpm. Das Lysat wurde abschließend bei 16.000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Stimulation und Lyse von THP-1-Zellen und PBMCs

Sowohl die THP-1-Zellen als auch die PBMCs wurden für die Behandlungsversuche am Tag des Experiments in ihren Zellkulturflaschen resuspendiert und dann zu je 1 ml auf mehrere 15 ml-Röhrchen verteilt (siehe Abschnitt 2.3.2). Diese Röhrchen wurden bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank gelagert, die Deckel wurden dabei lediglich aufgelegt und nicht zugeschraubt. Nach Zugabe einer Behandlungssubstanz sowie der gewählten Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Röhrchen sofort auf Eis gestellt und 10 ml eiskalter Waschpuffer zugegeben, um die Reaktion abzustoppen. Die Zellen wurden bei 500 x g für 5 min bei 4 °C herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Waschpuffer gelöst und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß übertragen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 500 x g für 5 min bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet möglichst trocken gesaugt. Anschließend wurden 50 µl Lysepuffer auf das Pellet gegeben, dieses auf einem Vortex-Schüttler gelöst, und die enthaltenen Zellen auf einem Thermomixer bei 4 °C für 10 min bei 1.000 rpm lysiert. Nach der abschließenden Zentrifugation zur Entfernung unlöslicher Bestandteile bei 16.000 x g für 15 min bei 4 °C wurde der Überstand aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.3 Alternative Lyse von THP-1-Zellen mit einem Bicine/CHAPS-Puffer und einem 2-Fraktionen-Lyse-System (NE-PER-Kit)

Alternativ zur Lyse mit dem M-PER-Reagenz wurden die THP-1-Zellen mit zwei weiteren Methoden lysiert. Die Stimulation und die Zellernte verliefen äquivalent zu Abschnitt 2.4.2, einschließlich des Waschlages im 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß.

Nachdem das Pellet trocken gesaugt worden war, wurden bei Verwendung des Bicine/CHAPS-Lysepuffers 150 µl (4 °C) auf das Zellpellet gegeben (20 mM Bicine, 0,6 % CHAPS, pH 7,6, 1x DMSO Inhibitor Mix, 1x Aqueous Inhibitor Mix) und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Pellet durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren resuspendiert und für weitere 30 min auf Eis inkubiert, wobei die Proben alle 5 min kurz auf einem Vortex-Schüttler gemischt wurden. Abschließend erfolgte die Zentrifugation zur Entfernung unlöslicher Bestandteile und die weitere Verarbeitung wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben.

In einzelnen Experimenten wurden die Zellen mit Hilfe des NE-PER-Kits (Thermo Scientific) aufgearbeitet, um so eine Fraktionierung in eine cytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion zu erreichen. Nachdem das Pellet trocken gesaugt worden war, wurden 142 µl der im Kit enthaltenen und auf 4 °C vorgekühlten Lösung CER I hinzugefügt (versetzt mit 1x DMSO-Inhibitor-Mix und 1x Aqueous-Inhibitor-Mix). Um das Zellpellet zu resuspendieren, wurde es anschließend 15 sec gründlich gemischt und danach 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 8 µl der mitgelieferten Lösung CER II und ein erneutes gründliches Mischen für 5 sec. Durch eine Zentrifugation bei 16.000 x g für 5 min bei 4 °C ließen sich die Zellkerne vom Cytoplasma trennen, welches nun im Überstand vorlag. Dieser wurde abgenommen, aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Das übrige Pellet wurde anschließend einmal gewaschen, um eine Kreuzkontamination der verbliebenen Kernfraktion mit Komponenten aus dem Cytoplasma zu minimieren. Dafür wurden erneut 150 µl vorgekühlter CER I-Puffer auf das übriggebliebene Pellet gegeben, es wurde auf einem Vortex-Schüttler gelöst und erneut wie oben beschrieben abzentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und verworfen. Im Anschluss wurden 71 µl des im Kit enthaltenen und vorgekühlten NE-Puffers (versetzt mit 1x DMSO Inhibitor Mix und 1x Aqueous Inhibitor Mix) auf das Pellet gegeben, dieses mittels Pipettieren resuspendiert und für 15 sec gründlich gemischt. Nach einer 40 minütigen Inkubation auf Eis, während der

die Proben alle 10 min für 15 sec auf einem Vortex-Schüttler gemischt wurden, konnte das Kernlysat durch Zentrifugation bei 16.000 x g für 10 min bei 4 °C von unlöslichen Bestandteilen separiert werden. Der Überstand wurde vom verbliebenen Pellet abgenommen, aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5 Statistische Analyse

Statistische Tests wurden mit der Graph Pad Prism 6 Software durchgeführt. Für die Auswertung der Daten aus der Pilot-Studie an humanen PBMCs wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's-Zweitest für multiple Vergleiche eingesetzt. Ein *P*-Wert < 0,05 wurde dabei als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Ziel des Projektes war die Etablierung und Weiterentwicklung einer geeigneten Methode zur sensitiven und hochauflösenden Analyse des ERK1/2-Phosphorylierungszustands. Da der CIEF-Immunoassay für diese Ziele hervorragend geeignet ist, wurden die Assay-Bedingungen für dieses Verfahren optimiert, von der Wahl der Behandlungssubstanz, über einen geeigneten Lysepuffer, bis hin zur optimalen eingesetzten Proteinmenge und der passenden Belichtungszeit. Auf diese Weise wurde zum einen die Unterscheidung der Threonin- und Tyrosin-monophosphorylierten ERK1- und ERK2-Isoformen ermöglicht und zum anderen die Kinetik ERK1/2-Phosphorylierung und –Dephosphorylierung in Zelllinien mit unterschiedlichen Stimuli näher untersucht. Diese Methodik wurde anschließend auf humane PBMCs übertragen und mit einer kleinen Pilot-Studie zur ERK1/2-Phosphorylierung abgeschlossen.

3.1 Detektion von ERK1/2 und phospho-ERK1/2 mittels Western Blot

Die MAP Kinasen ERK1 und ERK2 werden durch eine doppelte Phosphorylierung am konservierten TEY-Motiv aktiviert. Am Threonin oder am Tyrosin monophosphorylierte Formen existieren ebenfalls, allerdings ist nur wenig über ihre Funktion *in vivo* bekannt. ERK1 und ERK2 lassen sich durch die SDS-PAGE trennen, da ERK1 (auch p44 genannt) etwas höher im Gel läuft als ERK2 (p42).

Mit einem phosphorylierungssensitiven Antikörper lässt sich die ERK1/2-Aktivierung in verschiedenen Zellen über einen ausgewählten Stimulationszeitraum verfolgen und dokumentieren. Abbildung 3 zeigt die zeitabhängige Aktivierung bzw. Phosphorylierung der ERK1/2 MAP Kinasen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Die neuronale Zelllinie SH-SY5Y wurde für ausgewählte Inkubationszeiten mit PMA behandelt, die Zellen anschließend lysiert und im Western Blot mit zwei unterschiedlichen Antikörpern immungefärbt.

Der obere Western Blot zeigt die Detektion mit einem phosphorylierungsinsensitiven Antikörper (pan-ERK, für Antikörper siehe Tabelle 2), der die ERK1- und ERK2-Isoformen unabhängig von ihrem Phosphorylierungsstatus erkennt. Im unteren Western Blot ist die Detektion mit einem anti-phospho-ERK1/2-Antikörper dargestellt. Hier ist deutlich zu erkennen, dass zum Zeitpunkt 0 min nur sehr schwache Banden

mit dem anti-phospho-ERK1/2-Antikörper nachzuweisen waren. Nach PMA-Zugabe war eine deutliche Verstärkung der phospho-Signale zu detektieren, während in den Vehikel-Kontrollen die phospho-Signale auf Ausgangsniveau blieben. Bereits 2 min nach PMA-Zugabe war eine deutliche Erhöhung der phospho-Signale messbar. Diese stiegen über die Zeit weiter an und erreichten bei 10-20 min das Maximum und eine darauffolgende Plateauphase, während der die Phosphorylierung kaum wieder zurückging und auch nach 90 min noch hohe Signale messbar waren. Äquivalent zum Anstieg der Phosphorylierung änderte sich auch das Bandenprofil mit dem anti-pan-ERK1/2-Antikörper. Bei genauer Betrachtung konnten hier 4 Banden nachgewiesen werden, da jeweils eine weitere über der ERK1- und über der ERK2-Bande entstand. Hierbei handelte es sich um phosphorylierte Isoformen, welche im Gel geringfügig langsamer laufen als die nicht-phosphorylierten Varianten. Dieses Phänomen war lediglich bei nicht-physiologischen Stimulantien, wie z.B. dem hier verwendeten PMA, zu beobachten, da durch sie eine sehr hohe Phosphorylierungsrate für ERK1/2 erreicht wurde.

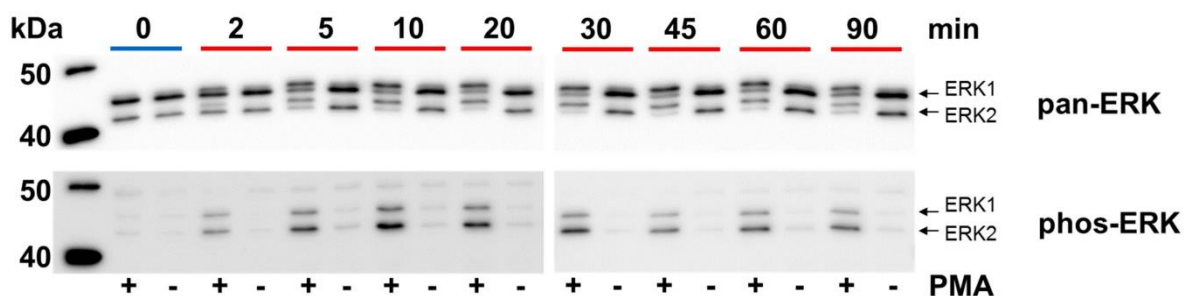


Abbildung 3: Darstellung der zeitabhängigen Aktivierung von ERK1/2 im Western Blot.

SH-SY5Y-Zellen wurden für 0, 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60 und 90 min mit 200 nM PMA oder für die gleichen Inkubationszeiten mit einem entsprechenden Vehikel behandelt und anschließend mit dem M-PER-Reagenz lysiert wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben. Die Auftrennung und Detektion erfolgte gemäß Abschnitt 2.2.2, 2.2.3 und 2.2.4. Die Immunfärbung wurde mit einem anti-pan-ERK1/2-Antikörper (CS #9102, 1:1.000) und einem anti-phospho-ERK1/2-Antikörper (Sigma #M8159, 1:2.000) durchgeführt (Tabelle 2). Für jeden Antikörpernachweis wurden separate SDS-Gele und Western Blots aus denselben Proben angefertigt.

3.2 ERK1/2-Detektion mit dem CIEF-Immunoassay

Durch ihre amphoteren Eigenschaften wandern Proteine in einem pH-Gradienten bis zur Stelle ihrer geringsten Nettoladung, welcher auch isoelektrischer Punkt (pI) genannt wird. Nach der Ladungstrennung auf der NanoPro™ 1000-Plattform und der Immobilisierung an die Kapillarienwand wurden verschiedene Varianten von ERK1 und ERK2 in einem automatisierten Verfahren mit spezifischen Antikörpern in Form von chemilumineszenten Signalen hochempfindlich detektiert.

3.2.1 Ablauf der Signaldetektion und pI-Berechnung im CIEF-Immunoassay

Der technische Ablauf zur Ermittlung der entsprechenden pI-Werte von Signalen in einer Probe ist schematisch in Abbildung 4 gezeigt. Nach der isoelektrischen Fokussierung werden zunächst die Signale der fluoreszenzmarkierten pH-Standards in der Kapillare über die CCD-Kamera aufgenommen (Abbildung 4a). Die detektierten Fluoreszenz-Signale werden in die Compass-Software übertragen, wo ihnen ein pH-Standard zugewiesen wird (Abbildung 4b). Die einzelnen Werte der pH-Standardproteine wurden zuvor in die Software einprogrammiert. Auf diese Weise werden sowohl Laufstreckenunterschiede zwischen den Kapillaren als auch das Laufverhalten in jeder einzelnen Kapillare verrechnet und damit das sogenannte Peak-Alignment durchgeführt. Durch den Ausgleich der Unterschiede in den tatsächlichen Laufstrecken ist auch das spätere Übereinanderlegen von Signalen zur Analyse möglich, ohne dass eine Verschiebung der Skala auftritt. Im nächsten Schritt werden die chemilumineszenten Signale aus der Probe in derselben Kapillare nach Zugabe des Substrat-Mixes über die CCD-Kamera aufgenommen (Abbildung 4c). Anhand der vorherigen Kalibrierung mit dem fluoreszenzmarkierten pH-Standard werden nun automatisch die pH-Werte für die einzelnen Signale in der Probe berechnet. Zudem wird hier auch eine Quantifizierung der Rohsignale durch Peak-Integration vorgenommen. Die Signalintensität wird abschließend gegen den pH-Wert, bzw. gegen den pI-Wert, den ein Protein an dieser Stelle des pH-Gradienten hat, aufgetragen und als Elektropherogramm in der Compass-Software ausgegeben (Abbildung 4d).

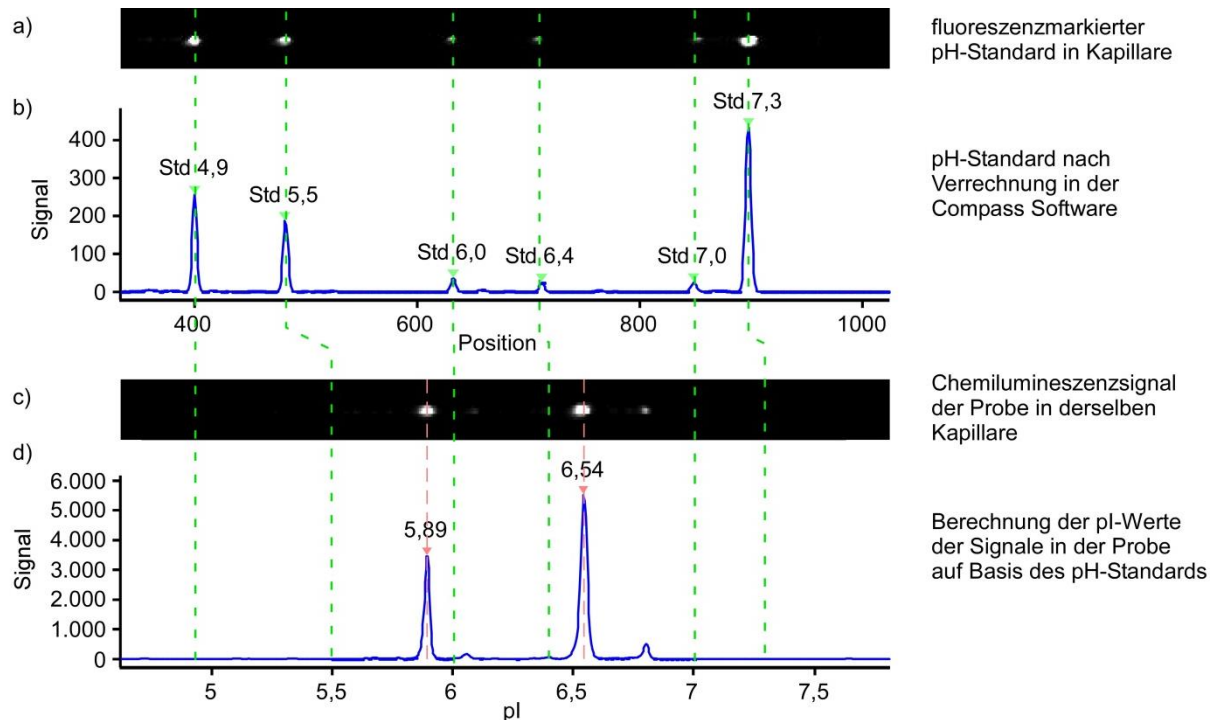


Abbildung 4: schematischer Ablauf zur automatisierten Berechnung eines Signal-pI-Wertes mit dem CIEF-Immunoassay.

Die Signale des fluoreszenzmarkierten Standards werden im NanoPro™ 1000-Gerät mit einer Kamera aufgenommen (a) und in die Compass Software übertragen, wo ihnen ein entsprechender pH-Standard zugewiesen wird (b). Nach Zugabe des Substrat-Mixes werden die Chemilumineszenzsignale aus der Probe mit der Kamera aufgenommen (c). Aufgrund des zuvor detektierten Standards werden den Probensignalen pI-Werte zugeordnet, die abschließend in der Software in Form eines Elektropherogramms ausgegeben werden (d).

3.2.2 ERK1- und ERK2-Peak-Identifizierung im CIEF-Immunoassay

Die Aktivierung von ERK1 und ERK2 bzw. die damit verbundene Phosphorylierung verändert den isoelektrischen Punkt der Enzyme. Durch die Bindung eines Phosphatrestes kommen negative Ladungen hinzu, die den pI-Wert des Proteins ins Saure verschieben. Durch die Bindung eines zweiten Phosphatrestes, wie es bei den vollständig aktivierten, doppelt-phosphorylierten ERK1/2 MAP Kinasen vorliegt, wird der pI-Wert nochmals weiter ins Saure verschoben. Auf diese Weise lassen sich mit dem CIEF-Immunoassay unphosphorylierte, einfach- und zweifach-phosphorylierte Formen dieser Kinasen aufgrund der unterschiedlichen isoelektrischen Punkte voneinander trennen. Da bereits die unphosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2 einen Unterschied in ihren isoelektrischen Punkten aufweisen, kann zusätzlich auch auf dieser Ebene eine Trennung erreicht werden.

Der erste Schritt für die Etablierung des CIEF-Immunoassays zur Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung in unserem Labor umfasste die Zuordnung und

Identifizierung der einzelnen auftretenden Signale bei dieser Methodik. Hierfür wurden PBMCs aus humanem Vollblut mit PMA stimuliert und die daraus hergestellten Zellysate durch isoelektrische Fokussierung auf einem NanoPro™ 1000-Gerät aufgetrennt. Zur immunologischen Detektion der unphosphorylierten (ERK1 und ERK2), monophosphorylierten (p-ERK1 und p-ERK2) und diphosphorylierten (pp-ERK1 und pp-ERK2) Isoformen von ERK1 und ERK2 und zur eindeutigen Zuordnung der verschiedenen Signale (Peaks) wurden insgesamt vier verschiedene Antikörper eingesetzt und verglichen (Abbildung 5). Der Einsatz des anti-ERK1- und des anti-ERK2-Antikörpers zeigte jeweils drei Signale, bei denen es sich um die beschriebenen un-, mono- und diphosphorylierten Isoformen handelte. Bei welchen dieser drei Peaks es sich jeweils um phosphorylierte Varianten handelte, ließ sich über einen Vergleich mit dem Elektropherogramm des anti-phospho-ERK1/2-Antikörpers feststellen. Der phosphorylierungsinsensitive anti-pan-ERK1/2-Antikörper detektierte alle ERK1/2-Isoformen in der Probe und wurde in den späteren Experimenten als alleiniger Detektionsantikörper im CIEF-Immunoassay eingesetzt. Da primäre Zellen und Zelllinien möglicherweise Unterschiede in der ERK1/2-Signalverteilung aufweisen könnten, wurde dieses Verfahren im Vorfeld auch bei der verwendeten humanen Zelllinie SH-SY5Y durchgeführt, um eventuell vorhandene Unterschiede auszuschließen. Der Vergleich erbrachte keine Abweichungen in der Peak-Zuordnung (Daten nicht gezeigt), d.h. den pI-Werten der einzelnen, bis dahin identifizierten Isoformen, sodass diese in den verwendeten Zelllinien und den humanen PBMCs analog durchgeführt werden konnte. Mit diesen Ergebnissen konnten die von O'Neill bereits publizierten Daten reproduziert und auf die in unserem Labor eingesetzten Zelllinien sowie die PBMCs übertragen werden (O'Neill *et al.*, 2006).

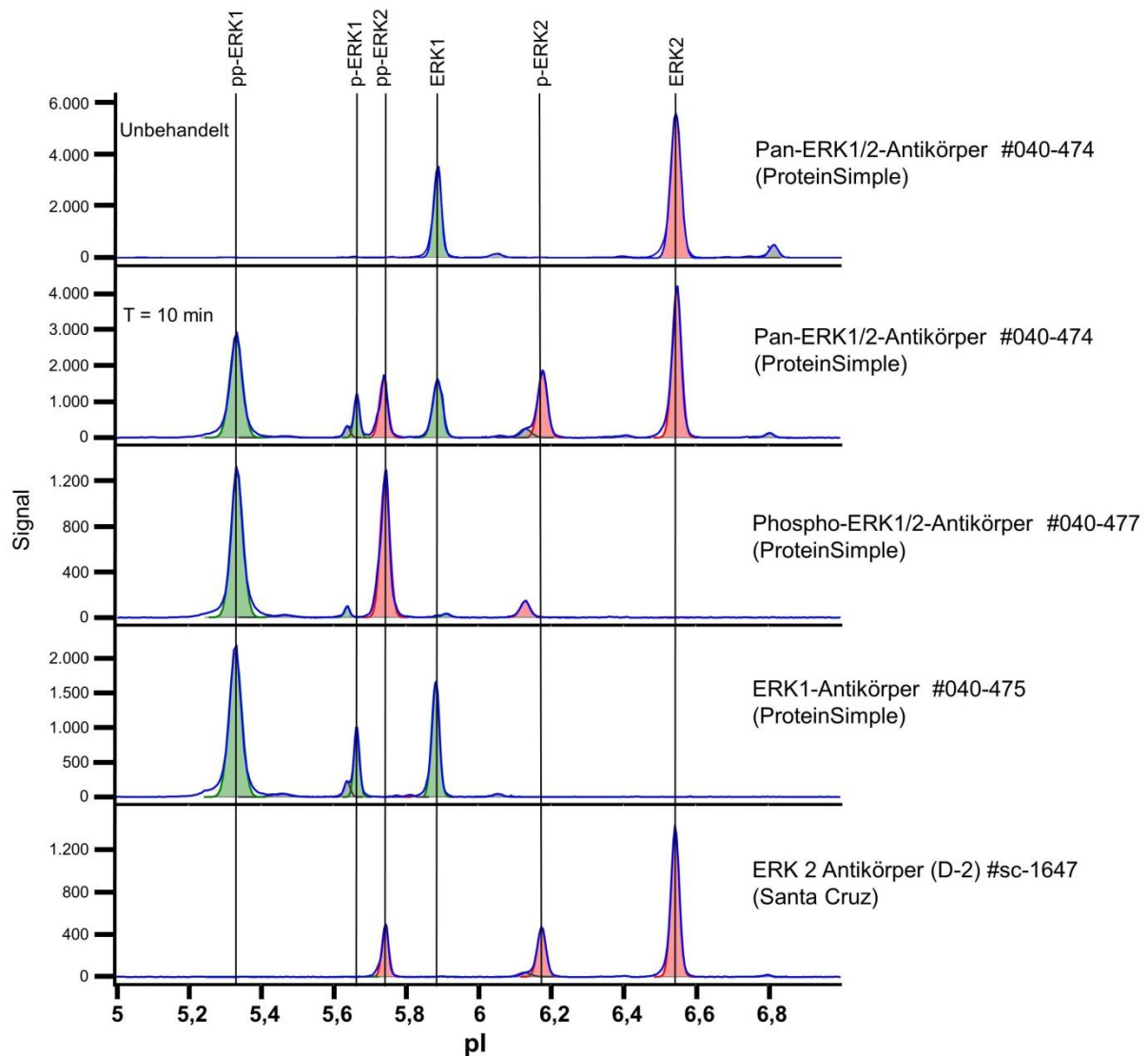


Abbildung 5: Identifizierung von unphosphorylierten, mono- und diphosphorylierten ERK1- und ERK2-Isoformen.

Humane PBMCs wurden unbehandelt belassen oder für 10 min mit 200 nM PMA behandelt, anschließend lysiert und im CIEF-Immunoassay mit verschiedenen Antikörpern immunodetektiert. Die Antikörper wurden wie in Tabelle 3 beschrieben eingesetzt. ERK1-Isoformen sind grün unterlegt und ERK2-Isoformen rot. ERK1/ERK2: unphosphoryliert, p-ERK1/p-ERK2: einfach-phosphoryliert, pp-ERK1/pp-ERK2: doppelt-phosphoryliert. Abbildung verändert nach Kraus *et al.*, 2015.

3.3 Auswahl eines geeigneten Lysepuffers

Es war von großer Wichtigkeit, dass der gewählte Lysepuffer eine hohe Ausbeute an phosphorylierten und unphosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2 aus unbehandelten und behandelten Zellen ermöglichte und möglichst direkt ohne weitere Arbeitsschritte mit dem CIEF-Immunoassay kompatibel war. Für diesen Zweck wurden drei Lysepuffer-Systeme getestet und sowohl im Western Blot als auch im CIEF-Immunoassay verglichen:

- Ein selbsthergestellter Bicine/CHAPS-Puffer (20 mM Bicine, 0,6 % CHAPS, pH 7,6)
- M-PER: Ein kommerziell erhältliches Lysereagenz, welche ein Gesamtlisat inkl. löslicher Kernfraktion erzeugt
- NE-PER: Ein kommerziell erhältliches 2-Fractionen-System, welches getrennte Lysate des Cytoplasmas und des Nucleus erzeugt

Wie in Abschnitt 2.4 und 2.4.3 vermerkt, wurden allen Lysepuffern Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zugegeben, um Proteinverluste durch Proteolyse und Dephosphorylierung zu vermeiden (1 x DMSO-Inhibitor-Mix und 1 x Aqueous-Inhibitor-Mix).

3.3.1 Vergleich der Lysepuffer im Western Blot

Die resultierenden Lysate wurden im Western Blot mit einem phosphorylierungsinsensitiven anti-pan-ERK1/2-Antikörper, einem anti-phospho-ERK-Antikörper und Antikörpern gegen das cytoplasmatische Protein Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) sowie gegen das nukleäre Protein Fibrillarin untersucht. In Abbildung 6 sind die Analysen der mit den genannten Lysepuffern erhaltenen Fraktionen im Western Blot vergleichend gezeigt.

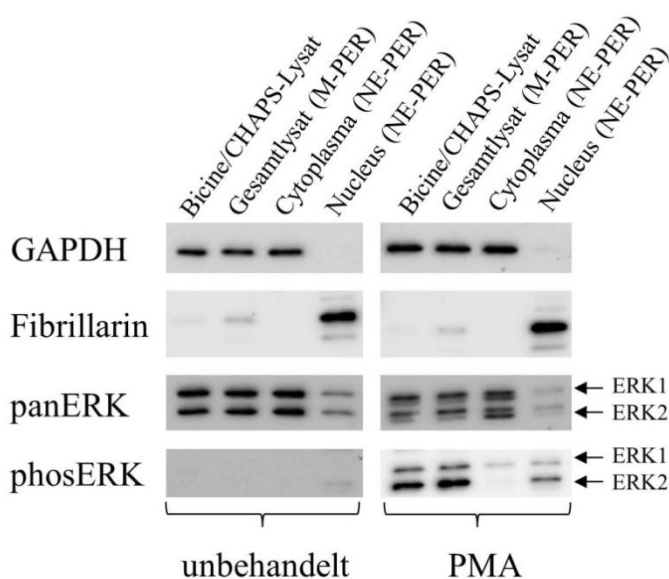


Abbildung 6: Test verschiedener Lysepuffer-Systeme im Western Blot.

THP-1 Zellen wurden unbehandelt lysiert oder für 10 min mit 200 nM PMA behandelt und lysiert wie in Abschnitt 2.4.2 und 2.4.3 beschrieben. Die Auftrennung und Detektion erfolgte gemäß Abschnitt 2.2.2, 2.2.3 und 2.2.4. Pro Spur wurden 500 ng Gesamtprotein aufgetragen. Für die Immunfärbung mit dem anti-pan-ERK1/2-Antikörper (CS #9102, 1:1.000), dem anti-phos-ERK1/2-Antikörper (Sigma #M8159, 1:2.000) und dem anti-Fibrillarin-Antikörper (Abcam #ab5821, 1:1.000) wurde die Membran für 1 h mit 2 % ECL Prime Blocking Reagent in PBS-T blockiert. Für den Nachweis von GAPDH (Abcam #9485, 1:3.000) wurde die Membran für 1 h mit 3 % BSA in PBS-T blockiert (siehe Tabelle 2).

Die Trennung der beiden Fraktionen aus dem NE-PER-Kit zeigte anhand der gewählten Marker kaum bis keine Kreuzkontamination. Fibrillarin war in der Cytoplasmafraktion nicht nachweisbar und GAPDH war in der Kernfraktion lediglich als schwache Bande sichtbar, was auf eine gute Trennung der cytosolischen Proteine von der Kernfraktion schließen lässt. Im Gesamtlysate mit dem M-PER-Reagenz war im Vergleich zum Bicine/CHAPS-Lysate eine deutlich intensivere Bande für den nukleären Marker Fibrillarin zu erkennen. Der Bicine/CHAPS-Puffer lysierte folglich teilweise die Zellkerne mit, allerdings war die Effizienz zur Lyse der Kerne beim M-PER-Reagenz deutlich höher, wodurch ein erhöhter Anteil der löslichen Kernfraktion im Gesamtlysate vorlag und damit in die Analysen einbezogen werden konnte.

Der Gesamtanteil von ERK1 und ERK2 war in der Cytoplasmafraktion bei Lyse mit dem NE-PER-Kit in unbehandelten und stimulierten Zellen deutlich höher als im Nucleoplasma. Der tatsächliche relative Anteil von ERK1/2 im Kernlysate war allerdings noch geringer als der in Abbildung 6 gezeigte Western Blot suggeriert, da gleiche Mengen an Gesamtprotein der jeweiligen Fraktion aufgetragen worden waren, die erhaltenen Cytoplasmafraktionen insgesamt aber wesentlich mehr Protein enthielten als die jeweils zugehörigen Kernlysate. Die mit dem anti-phospho-ERK1/2-Antikörper erzielten Signale, nach Aktivierung der Zellen mit PMA, waren in der nukleären Fraktion deutlich höher als im Cytoplasma, allerdings ist hier wieder der Unterschied in den aufgetragenen relativen Anteilen der Fraktionen zu beachten (s.o.). Phospho-ERK2 schien nach Behandlung dieser Zellen überwiegend im Kern lokalisiert zu sein, während phospho-ERK1 sowohl im Kern als auch im Cytoplasma nachgewiesen werden konnte. Mit dem anti-pan-ERK1/2-Antikörper zeigten sich die charakteristischen Doppelbanden, wie sie bereits in Abbildung 3 bei unphysiologischer Aktivierung zu sehen waren. Bei Lyse mit dem Bicine/CHAPS-Puffer und der M-PER-Reagenz sah das Doppelbandenprofil sehr ähnlich aus, mit einem hohen Anteil an phosphorylierten Isoformen.

3.3.2 Vergleich der Lysepuffer mit dem CIEF-Immunoassay

Im nächsten Schritt wurden Aliquots der hergestellten Lysate mit dem CIEF-Immunoassay untersucht. Das Bicine/CHAPS- und das M-PER-Lysate (Abbildung 7a und b) erzeugten nahezu deckungsgleiche Elektropherogramme in Bezug auf die

unphosphorylierten, mono- und diphosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2. In beiden Fällen erzeugten die doppelt-phosphorylierten Formen pp-ERK1 und pp-ERK2 in den mit PMA stimulierten Zellen deutlich stärkere Signale als die jeweiligen unphosphorylierten und einfach-phosphorylierten Varianten. In der NE-PER Cytoplasmafraktion (Abbildung 7c) konnten starke Signale für ERK2 und p-ERK2 neben einem vergleichsweise schwachen Signal für pp-ERK2 beobachtet werden. Die drei dargestellten ERK1-Isoformen wurden in der Cytoplasmafraktion mit ähnlich hohen Peaks nachgewiesen, während in der Kernfraktion eine relative Anreicherung von pp-ERK1 und pp-ERK2 beobachtet wurde (Abbildung 7d).

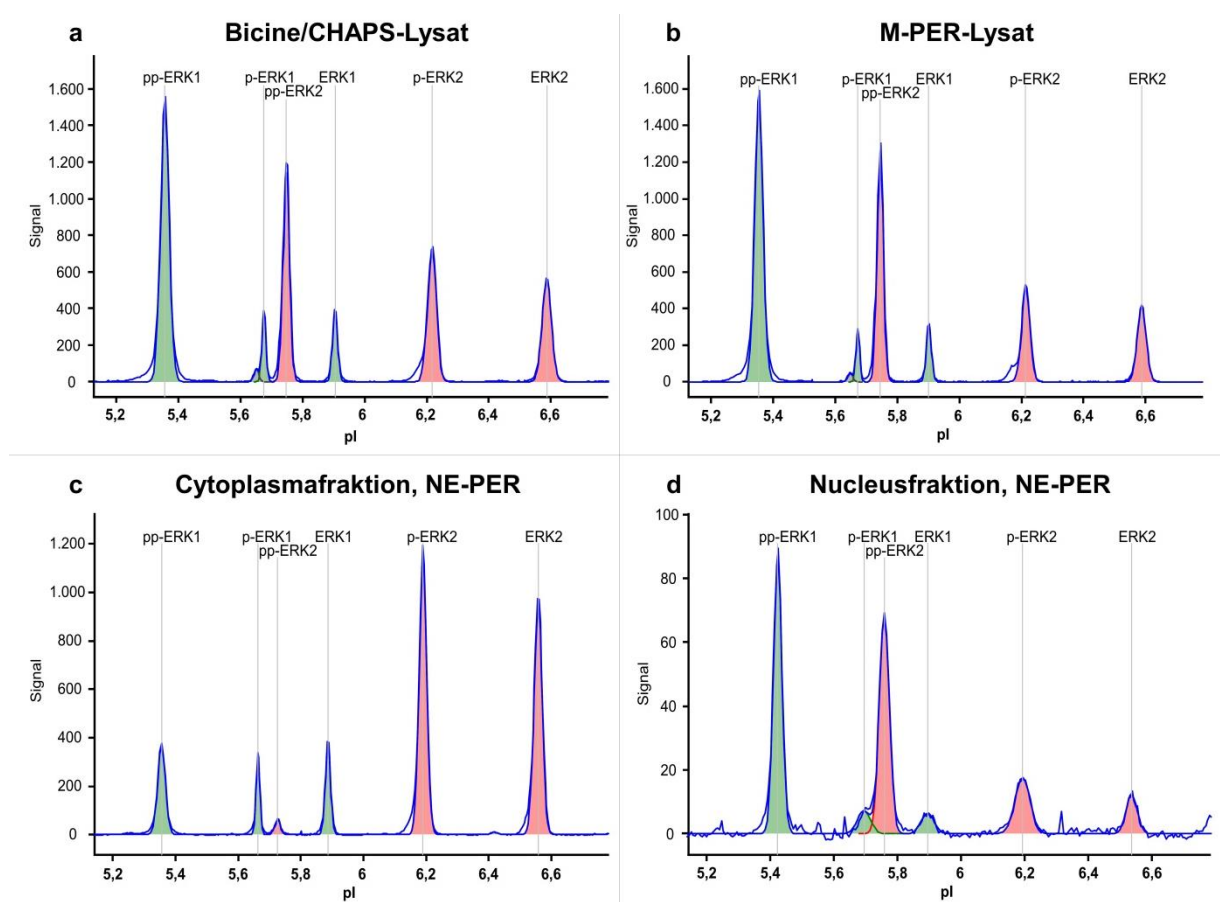


Abbildung 7: Vergleich von unterschiedlichen Lysepuffern im CIEF-Immunoassay.

THP-1-Zellen wurden gemäß Abschnitt 2.4.2 und 2.4.3 mit 200 nM PMA für 10 min behandelt, anschließend aufgeteilt und mit drei unterschiedlichen Puffer-Systemen lysiert. Die Detektion im CIEF-Immunoassay erfolgte mit einem anti-pan-ERK1/2-Antikörper wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben. Es wurde eine Endkonzentration von 0,1 mg/ml Gesamtprotein in die Kapillare geladen. a) Bicine/CHAPS-Lysat, weitestgehend cytoplasmatisch, b) M-PER-Lysat, Gesamtlisat inkl. löslicher Kernfraktion, c) Lysat der Cytoplasmafraktion aus NE-PER-Kit, d) Lysat der löslichen Kernproteine aus NE-PER-Kit (Nucleusfraktion).

Insgesamt waren die beobachteten Signale speziell für die doppelt-phosphorylierten Isoformen in den Fraktionen aus der Zellyse mit dem NE-PER-System auffällig

niedrig (man beachte die unterschiedliche Skalierung der in Abbildung 7 gezeigten Elektropherogramme). Wie schon in Abbildung 6 im Western Blot wurden auch im CIEF-Immunoassay gleiche Endkonzentrationen an Gesamtprotein der jeweiligen Fraktion eingesetzt.

3.3.3 Einfluss des Reduktionsmittels Dithiothreitol auf die ERK1/2-Detektion im CIEF-Immunoassay

Um zu überprüfen, ob ein nach Herstellerangaben in den NE-PER-Reagenzien enthaltenes nicht genau benanntes Reduktionsmittel einen Einfluss auf die Detektion mit dem CIEF-Immunoassay hatte, wurde in einem Kontrollexperiment ein Bicine/CHAPS-Lysat vor der isoelektrischen Fokussierung auf dem NanoPro™ 1000-Gerät mit 40 mM Dithiothreitol (DTT) versetzt. Ein Vergleich der Elektropherogramme von Bicine/CHAPS-Extrakten mit und ohne Zusatz von DTT ergab deutliche Unterschiede (Abbildung 8). Die Signale von unphosphoryliertem und monophosphoryliertem ERK1 und ERK2 schienen sich bei Vorhandensein des Reduktionsmittels zu verstärken. Das Signal des doppelt-phosphorylierten ERK1 blieb beim Einsatz von DTT im Bicine/CHAPS-Puffer scheinbar unbeeinflusst, das von doppelt-phosphoryliertem ERK2 dagegen war sehr stark verringert.

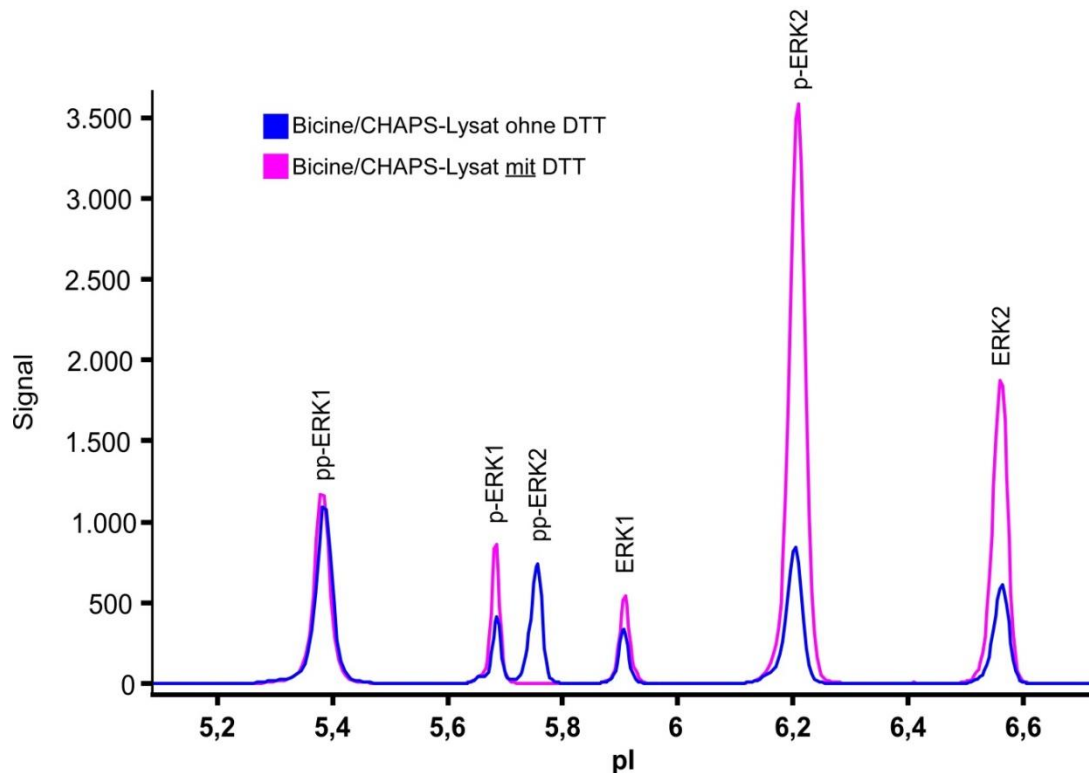


Abbildung 8: Nachweis des Einflusses von Reduktionsmitteln auf die ERK1/2-Detektion im CIEF-Immunoassay.

THP-1-Zellen wurden gemäß Abschnitt 2.4.3 mit 200 nM PMA für 60 min behandelt, anschließend aufgeteilt und mit dem Bicine/CHAPS-Puffer lysiert, welcher zusätzlich bei einer Probe 40 mM DTT enthielt. Die Detektion im CIEF-Immunoassay erfolgte mit einem phosphorylierungsinsensitiven anti-pan-ERK1/2-Antikörper. Das Bicine/CHAPS-Lysat mit der blauen Kurve enthielt kein Reduktionsmittel und ist damit äquivalent zu Abbildung 7a. Die rosa Kurve zeigt das Bicine/CHAPS-Lysat mit Zugabe des Reduktionsmittels DTT.

Für alle weiteren Versuche wurde aufgrund der vorliegenden Ergebnisse das M-PER-Reagenz gewählt, welches einen Gesamtextrakt der Zellen inkl. der löslichen Kernproteine erzeugt. Das Protokoll zur Zellyse beinhaltet weniger Arbeitsschritte als für den Bicine/CHAPS-Puffer und das NE-PER-System, die Effizienz zur Lyse der Zellkerne war höher als beim Bicine/CHAPS-Puffer und es enthielt kein die Analyse störendes Reduktionsmittel, wie die Puffer des NE-PER-Kits. Das M-PER-Reagenz ist kompatibel mit dem CIEF-Immunoassay und ermöglicht unter den hier angewendeten experimentellen Bedingungen den Nachweis und die Differenzierung von unphosphorylierten, monophosphorylierten und diphosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2 mit guten Signalstärken.

3.4 Detektion verschiedener phospho-Isoformen von ERK1 und ERK2 mittels CIEF-Immunoassay

Nachdem die optimalen Assay-Bedingungen definiert worden waren, wurden die ersten zeitabhängigen Stimulationen mit diesen Konditionen in verschiedenen Zelllinien durchgeführt und die Phosphorylierung von ERK1/2 mit dem CIEF-Immunoassay näher betrachtet. Dafür wurden humane monozytäre (THP-1) Zellen mit PMA stimuliert, nach unterschiedlichen Inkubationszeiten lysiert und im CIEF-Immunoassay mit einem phosphorylierungsinsensitiven anti-pan-ERK1/2-Antikörper analysiert. Eine analoge Stimulation ist bereits in Abbildung 3 für SH-SY5Y-Zellen im Western Blot gezeigt worden, wobei sich eine schnelle und anhaltende ERK1/2-Phosphorylierung beobachten ließ. Allerdings war dort keine Unterscheidung von mono- und diphosphoryliertem ERK1/2 bei Verwendung eines einzigen Antikörpers möglich. Für die THP-1-Zellen im CIEF-Immunoassay konnte ebenfalls ein schnelles und anhaltendes Auftreten sowohl für mono- als auch für diphosphorylierte ERK1- und ERK2-Isoformen beobachtet werden (Abbildung 9a und b). Das Maximum der Phosphorylierung wurde nach ungefähr 30 bis 45 min erreicht. Hinsichtlich ERK1 stellte die diphosphorylierte Isoform den größeren Anteil dar, während monophosphoryliertes ERK2 abundanter war als diphosphoryliertes ERK2. Ein repräsentatives Elektropherogramm von einem Zelllysate nach einer 2 minütigen Aktivierung mit PMA ist in Abbildung 9c gezeigt. Bei näherer Betrachtung der Elektropherogramme war zu beobachten, dass die monophosphorylierten Signale von ERK1 und ERK2 nach relativ kurzer Inkubationszeit mit PMA wiederholt als zwei Signale auftraten, die allerdings nicht vollständig aufgetrennt waren (Abbildung 9d und e, siehe auch Abbildung 5).

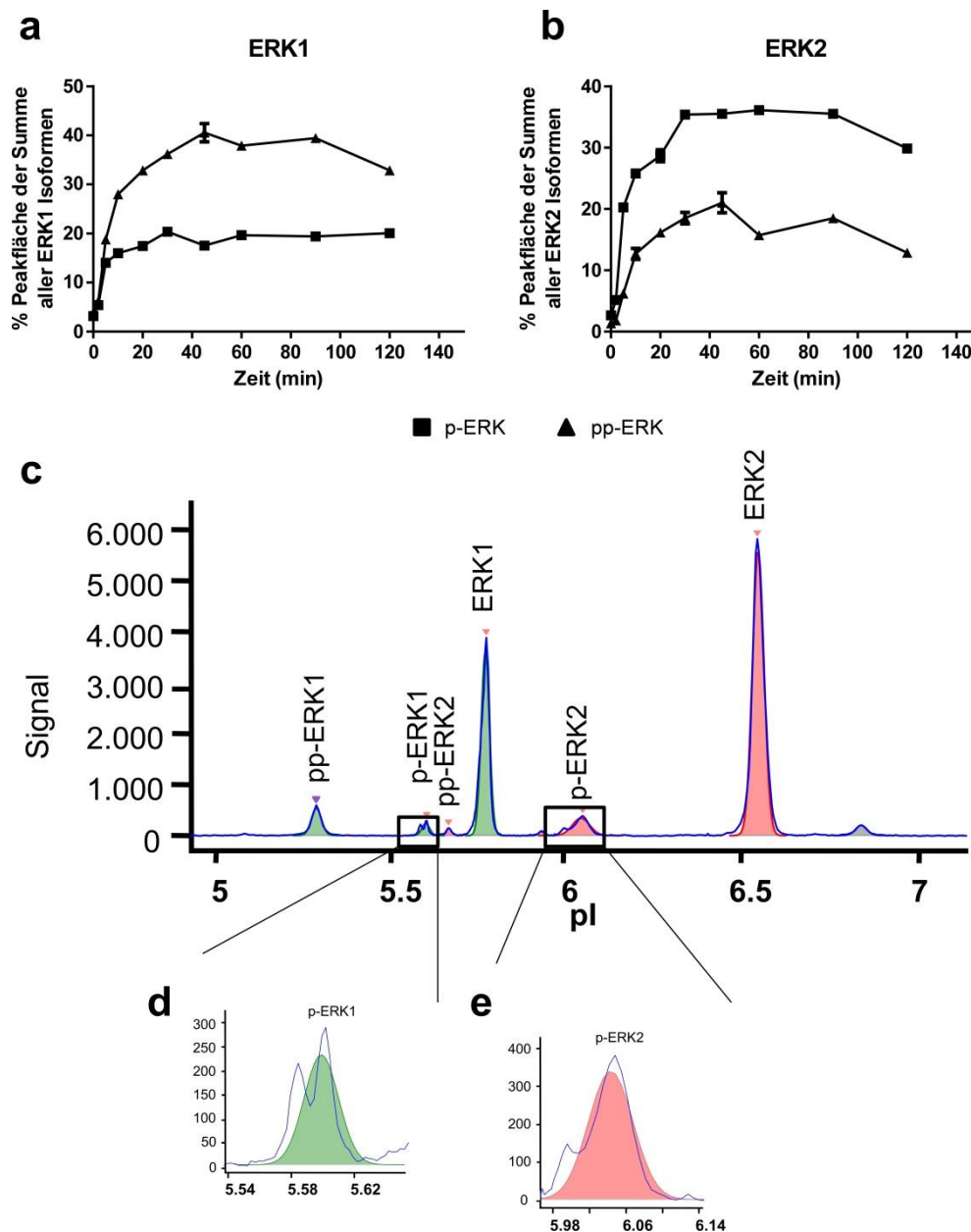


Abbildung 9: Auftreten von mono- und diphosphoryliertem ERK1 und ERK2 in PMA-aktivierten THP-1 Zellen.

THP-1-Zellen wurden mit 200 nM PMA behandelt und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten lysiert (0, 2, 4, 8, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min). Die Lysate wurden im CIEF-Immunoassay mit einem anti-pan-ERK1/2-Antikörper (ProteinSimple) analysiert. Die relativen Peakflächen von mono- und diphosphoryliertem ERK1 (a) und ERK2 (b) sind gezeigt. Quadrate repräsentieren die monophosphorylierten und Dreiecke die doppelt-phosphorylierten ERK1/2-Isoformen (Mittelwert \pm SD von technischen Duplikaten). Ein repräsentatives Elektropherogramm nach 2 min PMA-Stimulation ist in (c) gezeigt. Die Vergrößerungen demonstrieren, dass die Signale, die mit monophosphoryliertem ERK1 (p-ERK1) (d) und ERK2 (p-ERK2) (e) korrespondierten jeweils als zwei getrennte Signale auftraten, welche nicht vollständig aufgelöst waren. Abbildung verändert nach Kraus *et al.*, 2015.

3.4.1 Selektive Immundetektion der monophosphorylierten Teilsignale von ERK1 und ERK2

Um zu beurteilen, ob dieses Ergebnis in einer anderen Zelllinie mit einem mehr physiologischen Aktivator der ERK1/2-Signalkaskade reproduziert werden konnte,

wurden SH-SY5Y-Zellen mit Bradykinin behandelt. Ein repräsentatives Elektropherogramm nach 4 minütiger Inkubationszeit, welches unter Verwendung eines phosphorylierungsinsensitiven anti-pan-ERK1/2-Antikörpers (blaue Kurve) und zwei verschiedener anti-phospho-ERK1/2-Antikörper (rosa und grüne Kurve) erzeugt wurde, ist in Abbildung 10a gezeigt. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei PMA-aktivierten THP-1-Zellen (siehe Abschnitt 3.4) erzeugte die Detektion mit dem anti-pan-ERK1/2-Antikörper je zwei Signale für monophosphoryliertes p-ERK1 bzw. p-ERK2. Die beiden eingesetzten anti-phospho-ERK1/2-Antikörper zeigten offenbar unterschiedliche Selektivitäten für diese mutmaßlichen p-ERK1- und p-ERK2-Isoformen (Abbildung 10b und c). Der monoklonale Antikörper #4377 (Cell Signaling) erkannte selektiv das jeweils etwas saurer gelegene Signal bei p-ERK1 und p-ERK2. Im Gegensatz dazu zeigte der ebenfalls monoklonale Antikörper #4370 (Cell Signaling) eine Präferenz für das jeweils leicht alkalischere p-ERK1- und p-ERK2-Signal. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in THP-1-Zellen, sowie in humanen PBMCs erzeugt, welche aus frischem Vollblut isoliert und mit PMA oder NMDA in Kombination mit Glycin stimuliert worden waren (Daten nicht gezeigt).

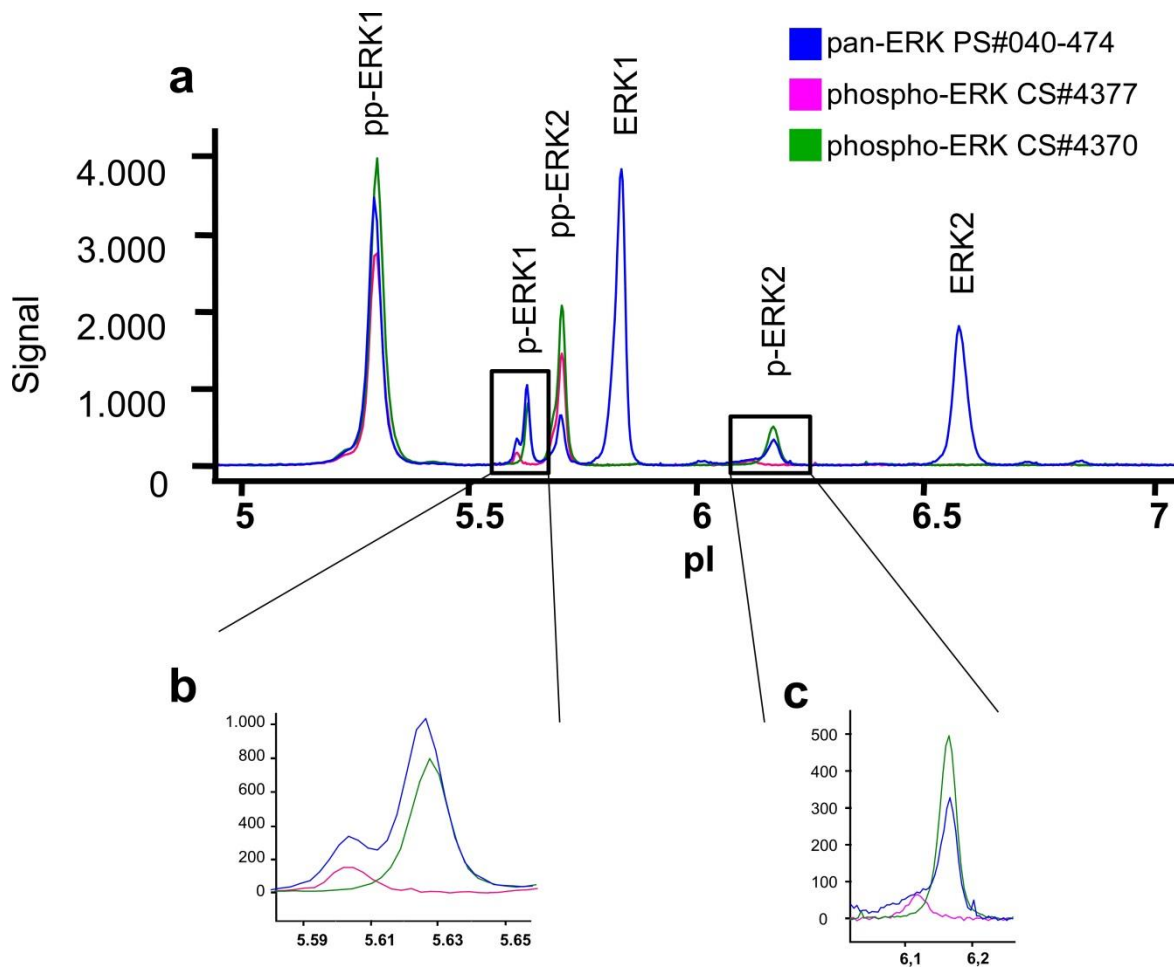


Abbildung 10: Auflösung der monophosphorylierten ERK1- und ERK2-Doppelpeaks mit verschiedenen anti-phospho-ERK1/2-Antikörpern.

SH-SY5Y-Zellen wurden mit 100 nM Bradykinin für 4 min behandelt und die Lysate dem CIEF-Immunoassay zugeführt (a). Die Immundetektion wurde mit dem phosphorylierungsinsensitiven anti-pan-ERK1/2-Antikörper PS#040-474 durchgeführt (blaue Kurve), sowie mit dem anti-phospho-ERK1/2-Antikörper CS#4377 (rosa Kurve) und dem anti-phospho-ERK1/2-Antikörper CS#4370 (grüne Kurve). Die Vergrößerungen zeigen zwei klar trennbare Signale innerhalb des Doppelpeaks für die p-ERK1- (b) und p-ERK2- (c) Peakfläche und verdeutlichen die unterschiedlichen Selektivitäten der beiden anti-phospho-ERK1/2-Antikörper. Abbildung verändert nach Kraus *et al.*, 2015.

3.5 Eindeutige Identifizierung von pT- und pY-monophosphorylierten ERK1/2-Isoformen durch kompetitive Blockierung

Die Identifikation der beiden monophosphorylierten Signale von ERK1 bzw. ERK2 erfolgte im CIEF-Immunoassay durch kompetitive Blockierung der ausgewählten Antikörper mit synthetischen Peptiden. Diese Peptide können zur Überprüfung der Selektivität von Antikörpern eingesetzt werden, indem sie mit dem Antigen um die Bindungsstellen des Antikörpers kompetieren. Enthält das verwendete Peptid das Epitop des passenden Antikörpers und wird in relativ großen Mengen angeboten, kann dieser an das Peptid binden und steht damit nicht mehr zur weiteren

Immundetektion eines Zielproteins zur Verfügung, was sich in einer Verringerung oder Auslöschung des Zielsignals zeigt. Dieses Verfahren wurde für die vorliegenden Untersuchungen erstmalig im CIEF-Immunoassay eingesetzt.

Als geeignete Probe für diesen Versuch wurden humane PBMCs aus Vollblut von gesunden Freiwilligen mit 200 nM PMA für 10 min behandelt, um einen hohen Phosphorylierungsgrad von ERK1 und ERK2 zu gewährleisten. Für die kompetitiven Blockierungsexperimente, wurden die folgenden synthetischen Peptide verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Borek Vojtesek, Moravian Biotechnology, Brno, Tschechische Republik), welche das ERK1/2-Aktivierungsmotiv enthielten:

- unphosphoryliert KTGFLTEYVATR
- doppelt-phosphoryliert KTGFL(pT)E(pY)VATR (pp-Peptid)
- pT-monophosphoryliert KTGFL(pT)EYVATR (pT-Peptid)
- pY-monophosphoryliert KTGFLTE(pY)VATR (pY-Peptid)

Der aminoternale Lysinrest (K) ist nicht Teil der ERK-Aminosäuresequenz, sondern wurde hinzugefügt, um die Peptide in einem anderen Kontext an ein Trägerprotein für Immunisierungen koppeln zu können. Die vier Peptide wurden separat mit den drei folgenden unterschiedlichen anti-phospho-ERK1/2-Antikörpern gemischt und das Gemisch anschließend im CIEF-Immunoassay eingesetzt:

- #040-477 (ProteinSimple)
- #4370 (Cell Signaling)
- #4377 (Cell Signaling)

Bei Vorinkubation des pp-Peptides mit jedem der drei getesteten anti-phospho-ERK1/2-Antikörper waren anschließend mit dem CIEF-Immunoassay keine Signale messbar (Daten nicht gezeigt). Dieses Peptid band alle Antikörper gleichermaßen und unterdrückte damit die Immundetektion. Das pT-Peptid blockierte zwar die Immundetektion von mono- und diphosphorylierten ERK-Isoformen durch den Antikörper #4370, aber nicht durch den Antikörper #4377 oder #040-477 (Abbildung 11a-c). Im Gegensatz dazu blockierte das pY-Peptid die Immundetektion von mono- und diphosphoryliertem ERK1 und ERK2 durch den Antikörper #4377 und #040-477, aber nicht durch #4370 (Abbildung 11d-f). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Antikörper #4370 diphosphoryliertes und pT-monophosphoryliertes ERK1 und ERK2 detektiert, während die Antikörper #4377 und #040-477 diphosphoryliertes

und pY-monophosphoryliertes ERK1/2 erkennen. Die gewählten Antikörper erlauben somit eine eindeutige Identifizierung der verschiedenen monophosphorylierten ERK1- und ERK2-Signale. Folglich konnte das jeweils saurere der monophosphorylierten Teilsignale pY-ERK1 bzw. pY-ERK2 zugewiesen werden. Die geringfügig alkalischeren Signale wurden dementsprechend als pT-ERK1 und pT-ERK2 identifiziert. Das unphosphorylierte Peptid diente als Kontrolle und hatte keinerlei Effekt auf die spezifische Antikörperbindung (Daten nicht gezeigt).

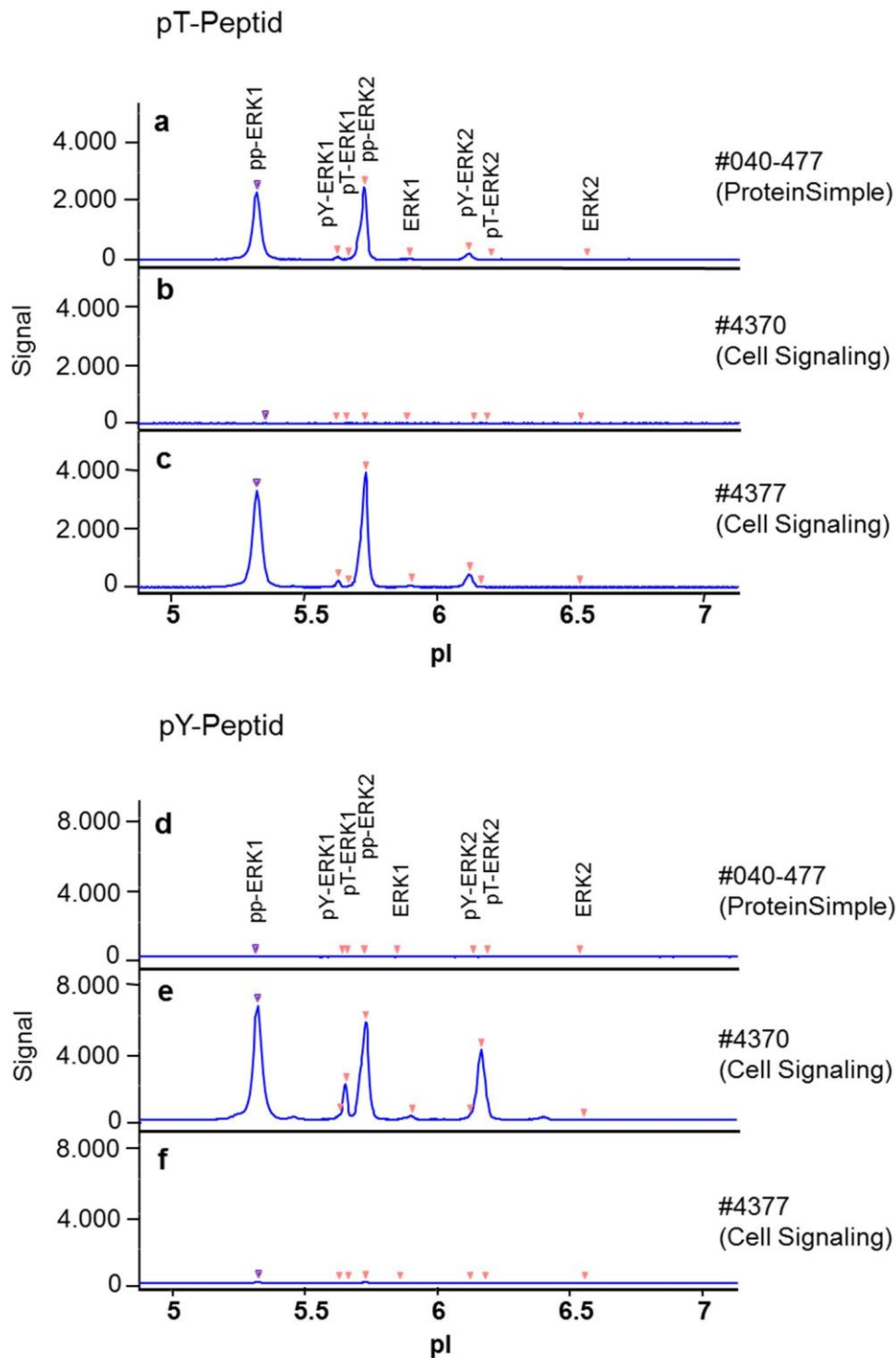


Abbildung 11: Kompetitive Blockierung der spezifischen Antikörperbindung mit synthetischen Peptiden.

Als Probe wurden lysierte PBMCs verwendet, welche zuvor mit 200 nM PMA für 10 min stimuliert worden waren. Die Peptide wurden wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben vorverdünnt, mit den Antikörpern gemischt und anschließend im CIEF-Immunoassay eingesetzt. Es wurden 10 µg/ml des pT-Peptides und 50 µg/ml des pY-Peptides verwendet, um eine optimale Blockierung der Antikörper zu erreichen. Das pT-Peptid wurde mit den anti-phospho-ERK1/2-Antikörpern #040-477 (a), #4370 (b) und #4377 (c) gemischt. Dementsprechend wurde das pY-Peptid ebenfalls mit den Antikörpern #040-477 (d), #4370 (e) und #4377 (f) gemischt. Abbildung verändert nach Kraus *et al.*, 2015.

3.6 Intra- und Interassayvarianz im CIEF-Immunoassay

Um die technische Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus dem CIEF-Immunoassay zu prüfen, wurden die Varianzen zwischen verschiedenen Läufen und auch innerhalb eines Laufes ermittelt und verglichen. Hierfür wurden zunächst THP-1-Zellen mit MCP-1 behandelt und mit dem M-PER-Puffer lysiert. Für die Bestimmung der technischen Schwankungen innerhalb eines Laufes (Intraassayvarianz) wurden $n = 24$ Replikate von je einer aktivierten und einer nicht-aktivierten Probe angelegt. Die Varianzen wurden für jedes Signal, unter Verwendung der prozentualen Flächeninhalte, separat bestimmt (Tabelle 4). Ein Vergleich der absoluten Flächeninhalte der Signale erbrachte deutlich höhere Variationskoeffizienten, weshalb für alle weiteren Auswertungen mit den prozentualen bzw. relativen Flächeninhalten (AUC) gearbeitet wurde. Für die THP-1-Zellen wurden generell nur sehr geringe Variationskoeffizienten beobachtet. Der höchste Wert mit ca. 7,5 % CV wurde für pp-ERK2 bei unstimulierten Zellen errechnet. Die meisten Werte lagen im Bereich von 2-6 %, lediglich die unphosphorylierten Signale wiesen eine Streuung von 1 % CV oder weniger auf.

Tabelle 4: Berechnung der Intraassayvarianz aus $n = 24$ Replikaten bei THP-1-Zellen.

Die THP-1-Zellen wurden unbehandelt gelassen (nicht-aktiviert) oder für 2 min mit 100 ng/ml MCP-1 behandelt (aktiviert) und die Lysate im CIEF-Immunoassay mit einem anti-pan-ERK1/2-Antikörper analysiert. Zur Auswertung wurden die prozentualen Flächeninhalte an der Summe der Flächen aller ERK1- bzw. ERK2-Signale verwendet.

		ERK1				ERK2			
		nonp	pT	pY	pp	nonp	pT	pY	pp
nicht-aktiviert	Mittelwert	90,85	3,29	2,25	3,62	95,65	1,53	1,12	1,70
	Standardabweichung	0,35	0,15	0,08	0,16	0,23	0,09	0,06	0,13
	% CV	0,39	4,60	3,65	4,45	0,24	5,65	5,29	7,54
aktiviert	Mittelwert	69,82	9,97	5,28	14,93	81,07	9,10	3,35	6,48
	Standardabweichung	0,89	0,46	0,32	0,34	0,59	0,25	0,11	0,39
	% CV	1,28	4,59	6,05	2,25	0,73	2,75	3,37	6,01

Analog wurde dieses Verfahren auch mit PBMCs durchgeführt, welche in diesem Experiment allerdings nur schwach auf die Stimulation reagierten. Wie aus Abbildung 12 und Tabelle 5 hervorgeht, konnte dennoch eine eindeutige ERK1/2-Phosphorylierung mit zum Teil einer Verdoppelung oder Verdreifachung der relativen Flächenanteile der jeweiligen phospho-Formen nach Stimulation nachgewiesen werden. Trotz der geringen Aktivierung lagen die Variationskoeffizienten der meisten

Signale innerhalb eines Assays unter 10 %, für die nicht-phosphorylierten Isoformen sogar unter 1 %. Grundsätzlich galt hierbei: Je höher das Signal, desto geringer die Abweichung. Da es sich bei der pY-monophosphorylierten Variante von ERK1 und ERK2 um eine unterrepräsentierte Isoform handelte, waren hier die Abweichungen höher. In der nicht-aktivierten Probe lagen viele der Signale nur knapp über dem Hintergrund und zeigten deshalb stärkere Streuung zwischen den technischen Replikaten.

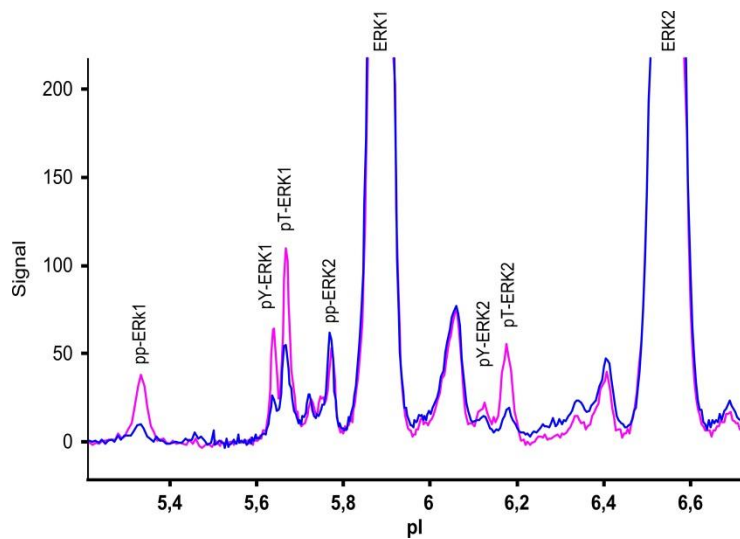


Abbildung 12: Vergleich der ERK1/2-Aktivierung in unbehandelten und stimulierten PBMCs im CIEF-Immunoassay.

PBMCs aus humanem Vollblut wurden für 4 min mit 50 μ M NMDA in Kombination mit 10 μ M Glycin stimuliert und anschließend mit der M-PER-Reagenz lysiert. Die Analyse der Lysate im CIEF-Immunoassay erfolgte mit einem anti-pan-ERK1/2-Antikörper (PS #040-474). Die Elektropherogramme stellen Ausschnittsvergrößerungen mit Fokus auf die phospho-Signale dar, sodass die Signale von unphosphoryliertem ERK1 und ERK2 nicht vollständig abgebildet sind. Die blaue Kurve zeigt die unstimulierten PBMCs und die pinke Kurve zeigt die NMDA-stimulierten Zellen.

Tabelle 5: Berechnung der Intraassayvarianz aus $n = 24$ Replikaten bei PBMCs.

Die PBMCs wurden unbehandelt gelassen (nicht-aktivierte Probe) oder mit 50 μ M NMDA in Kombination mit 10 μ M Glycin für 4 min behandelt (aktivierte Probe) und die Lysate im CIEF-Immunoassay mit einem anti-pan-ERK1/2-Antikörper analysiert. Zur Auswertung wurden die prozentualen Flächeninhalte an der Summe der Flächen aller ERK1- bzw. ERK2-Signale verwendet.

		ERK1				ERK2			
		nonp	pT	pY	pp	nonp	pT	pY	pp
nicht-aktiviert	Mittelwert	98,20	1,23	0,36	0,20	98,57	0,19	0,16	1,08
	Standardabweichung	0,36	0,06	0,04	0,34	0,15	0,05	0,04	0,09
	% CV	0,36	5,18	10,91	168,64	0,15	28,45	26,82	7,94
aktiviert	Mittelwert	96,74	1,77	0,94	0,55	97,99	0,78	0,30	0,87
	Standardabweichung	0,27	0,15	0,11	0,03	0,41	0,05	0,07	0,09
	% CV	0,28	8,49	11,54	6,09	0,42	6,61	24,03	10,63

Für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit von Messergebnissen aus verschiedenen Messungen (Interassayvarianz) wurden die Lysate von aktivierten und nicht-aktivierten PBMCs in $n = 5$ unabhängigen CIEF-Immunoassays an unterschiedlichen Versuchstagen analysiert und verglichen. Hierfür wurde für jeden Assay ein frisches Aliquot derselben Probe verwendet. Die Berechnung der Interassayvarianz in Tabelle 6 erfolgte ebenfalls mit Hilfe der prozentualen Flächeninhalte.

Tabelle 6: Berechnung der Interassayvarianz aus $n = 5$ Wiederholungen bei PBMCs.

Die PBMCs wurden unbehandelt gelassen (nicht-aktivierte Probe) oder mit 200 nM PMA für 10 min behandelt (aktivierte Probe) und die Lysate anschließend im CIEF-Immunoassay an unterschiedlichen Versuchstagen mit einem anti-pan-ERK1/2-Antikörper analysiert. Zur Auswertung wurden die prozentualen Flächeninhalte an der Summe der Flächen aller ERK1- bzw. ERK2-Signale verwendet.

		ERK1				ERK2			
		nonp	pT	pY	pp	nonp	pT	pY	pp
nicht-aktiviert	Mittelwert	98,48	0,97	0,36	0,20	98,60	0,25	0,20	0,96
	Standardabweichung	0,15	0,10	0,05	0,05	0,24	0,10	0,11	0,17
	% CV	0,16	10,84	13,77	23,23	0,25	42,12	54,15	17,32
aktiviert	Mittelwert	28,24	20,53	5,29	45,94	33,87	18,53	3,71	43,89
	Standardabweichung	1,41	1,30	0,34	1,17	1,50	1,02	0,15	2,26
	% CV	5,00	6,33	6,51	2,56	4,43	5,49	4,06	5,15

Bei der aktivierten Probe lagen die Variationskoeffizienten ebenfalls alle unter 10 %, die meisten davon im Bereich von 5-6 %. Die nicht-aktivierte Probe zeigte geringfügig höhere Werte als bei der Intraassayvarianz. Die nicht-phosphorylierten Signale wiesen lediglich eine Streuung von unter 1 % CV auf, während sämtliche phospho-Isoformen nur knapp über dem Hintergrundrauschen lagen und damit stärkerer Schwankung ausgesetzt waren.

Die Daten belegen, dass der CIEF-Immunoassay eine geeignete Methode ist, um die ERK-Phosphorylierung vor allem in Bezug auf die einzelnen phospho-Isoformen zu untersuchen. Durch die Verrechnung der Signale bei Verwendung eines anti-pan-ERK1/2-Antikörpers werden nicht nur Abweichungen in den absoluten Signalintensitäten zwischen unterschiedlichen Kapillaren oder Läufen relativiert, sondern es ermöglicht auch eine semi-quantitative Analyse auf dieser Basis. Eine akzeptable Reproduzierbarkeit (Variationskoeffizient $< 15\%$) wurde für Signale mit einem relativen Flächeninhalt von mindestens 1 % der aufsummierten Flächeninhalte aller ERK1- bzw. ERK2-Signale beobachtet.

3.7 Zeitabhängiges Auftreten von pT- und pY-ERK1/2-Isoformen in verschiedenen Zellen

Da der phosphorylierungsinsensitive anti-pan-ERK1/2-Antikörper (ProteinSimple) alle ERK-Isoformen detektiert, inklusive aller phosphorylierten Formen (Abbildung 10), können Experimente zur Kinetik der ERK1/2-Phosphorylierung mit spezifischem Fokus auf die Threonin- und Tyrosin-monophosphorylierten Formen mit einem einzigen Antikörper im CIEF-Immunoassay durchgeführt werden. Dies erlaubt eine direkte relative Quantifizierung aller verschiedenen phosphorylierten und unphosphorylierten ERK1- und ERK2-Signale in derselben Kapillare. Die im Rahmen dieser Arbeit erstmals aufgezeigte Möglichkeit zwischen pT- und pY-monophosphoryliertem ERK1/2 unterscheiden zu können (Kraus *et al.*, 2015) wurde im nächsten Schritt auf mehrere detaillierte Analysen von zeitabhängigen ERK1/2-Phosphorylierungsstadien angewandt.

3.7.1 Stimulation von SH-SY5Y-Zellen mit Bradykinin

SH-SY5Y-Zellen wurden mit 100 nM Bradykinin behandelt, die Inkubation wurde nach unterschiedlichen Zeiten gestoppt, die Zellen lysiert und mit dem CIEF-Immunoassay untersucht. Abbildung 13 zeigt ein repräsentatives von fünf voneinander unabhängigen Experimenten. Wie sich herausstellte, waren in Bradykinin-behandelten SH-SY5Y-Zellen zu allen getesteten Zeitpunkten die doppelt-phosphorylierten Formen pp-ERK1 und pp-ERK2 abundanter als die verschiedenen monophosphorylierten Varianten. Der maximale relative Anteil von 20 % für pp-ERK1 (Abbildung 13a) und 13 % für pp-ERK2 (Abbildung 13b) wurde im gezeigten Experiment nach 12 min erreicht. Die Threonin-monophosphorylierten Formen pT-ERK1 und pT-ERK2 waren deutlich häufiger als die Tyrosin-monophosphorylierten Formen pY-ERK1 bzw. pY-ERK2. Insgesamt stellten die Tyrosin-monophosphorylierten Varianten von ERK1 und ERK2 unter diesen experimentellen Bedingungen lediglich eine unterrepräsentierte Spezies dar. Das Auftreten von mono- und diphosphoryliertem ERK1 und ERK2 folgte im Zeitverlauf einem biphasischen Muster: Die ERK1-Aktivierung erreichte ein erstes Maximum nach 6 min, gefolgt von einem leichten Rückgang bis zum Zeitpunkt 10 min und einem zweiten Maximum nach 12 min, welches abschließend von einer kontinuierlichen aber langsamen Dephosphorylierung gefolgt wurde. Die

Phosphorylierungskinetik von ERK2 war ähnlich: Das erste Maximum wurde nach 8 min Inkubationszeit erreicht, gefolgt von einem leichten Rückgang und einem zweiten Maximum nach 12 min. Wie oben bereits erwähnt, wurde dieses Experiment fünfmal mit ähnlichem Ergebnis wiederholt. In allen Experimenten war eine biphasische ERK1/2-Aktivierung mit Maxima zu denselben Zeitpunkten zu beobachten und stets war pp-ERK1/2 die dominante Isoform, gefolgt von pT-ERK1/2 und pY-ERK1/2. Die berechneten prozentualen Flächeninhalte der verschiedenen phospho-ERK1/2-Isoformen an den unterschiedlichen Zeitpunkten variierten allerdings zu einem gewissen Anteil zwischen den unabhängigen Experimenten.

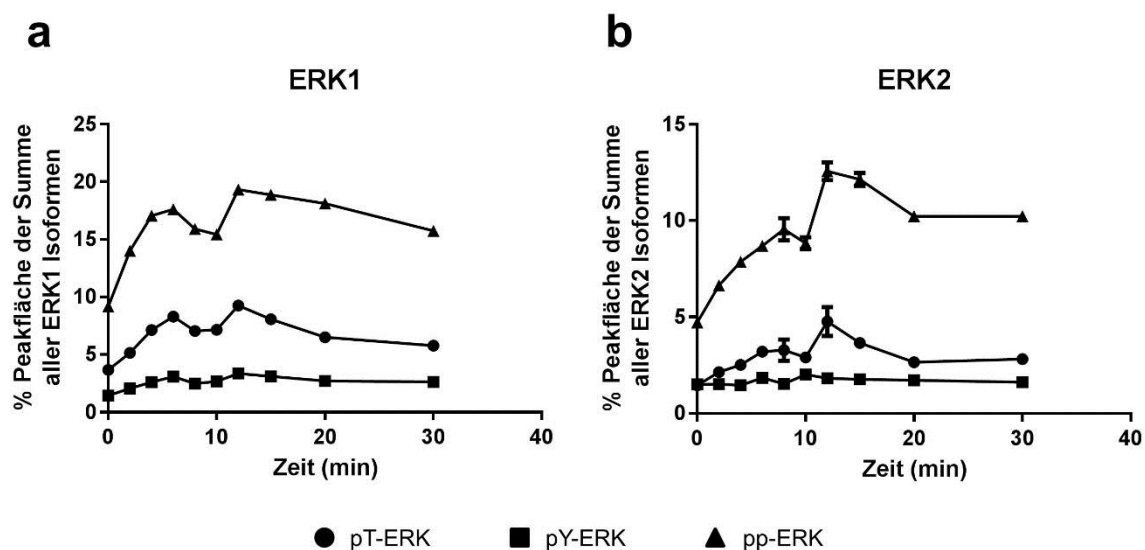


Abbildung 13: Zeitverlauf von BK-aktivierten SH-SY5Y-Zellen mit zusätzlicher Differenzierung von insgesamt 6 phospho-Isoformen.

SH-SY5Y-Zellen wurden mit 100 nM Bradykinin für unterschiedliche Inkubationszeiten (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30 min) stimuliert, lysiert und im CIEF-Immunoassay mit einem anti-pan-ERK1/2-Antikörper #040-477 (ProteinSimple) analysiert. Die relativen Abundanzen (Mittelwert \pm SD von technischen Duplikaten) von mono- und diphosphoryliertem ERK1 (a) und ERK2 (b) sind jeweils in Prozent der gesamten ERK1- bzw. ERK2-Signale gezeigt. Punkte repräsentieren Threonin-monophosphoryliertes ERK1/2, Quadrate die Tyrosin-monophosphorylierte ERK1/2-Isoform und Dreiecke das diphosphorylierte ERK1/2. Es ist ein repräsentatives von fünf unabhängigen Experimenten gezeigt. Abbildung verändert nach Kraus *et al.*, 2015.

3.7.2 Stimulation von THP-1-Zellen mit MCP-1

THP-1-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit 100 ng/ml MCP-1 behandelt und die Lysate anschließend im CIEF-Immunoassay untersucht. In Abbildung 14 ist ein repräsentatives von insgesamt drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Hier zeigte sich ein vollkommen anderes Bild als in den SH-SY5Y-Zellen. Für jede der 6 detektierbaren phospho-ERK1/2-Isoformen war das relative Maximum bereits nach 2 min erreicht, gefolgt von einem schnellen Rückgang, welcher nach 10 min das

Minimum erreichte. Dieser Wert lag bei jeder Isoform im Bereich des Anfangswertes oder sogar darunter. Auf das Minimum folgte ein erneuter, langsamer Anstieg, welcher besonders bei pT-ERK2, sowie allen drei ERK1-phospho-Formen ausgeprägt war. Die beiden Isoformen pT-ERK1 und pp-ERK1 zeigten im ausgewählten Experiment einen nahezu identischen Verlauf mit einer maximalen relativen Abundanz von jeweils 6 %, während pY-ERK1 nur einen Maximalwert von 3-4 % erreichte. Unter den verschiedenen ERK2-phospho-Spezies' war die Threonin-monophosphorylierte Variante pT-ERK2 mit einer relativen Abundanz von 5-6 % in diesem Experiment am stärksten vertreten, wohingegen pY-ERK2 und pp-ERK2 einen sehr ähnlichen Verlauf zeigten mit einem Maximum von jeweils etwa 2 %. Dieses Experiment wurde dreimal unabhängig mit ähnlichem Ergebnis wiederholt. In allen Wiederholungen waren die Maxima der Phosphorylierung nach 2 min zu beobachten, gefolgt von einer schnellen Dephosphorylierung, sodass nach 10 min wieder die Höhe des Anfangswertes erreicht wurde. Der nachfolgende Anstieg war ebenfalls in allen Wiederholungen zu beobachten, viel aber zum Teil geringer aus. Die Tyrosin-monophosphorylierte pY-ERK1-Isoform wies stets nur geringe relative Häufigkeit auf und wurde klar von pT-ERK1 und pp-ERK1 überragt. Die pT-ERK2-Variante war in allen Experimenten abundanter als pY-ERK2 und pp-ERK2. Wie auch schon bei der Behandlung der SH-SY5Y-Zellen variierten allerdings die berechneten prozentualen Flächeninhalte der differenzierten phospho-ERK1/2-Varianten an den unterschiedlichen Zeitpunkten zu einem gewissen Anteil zwischen den unabhängigen Experimenten.

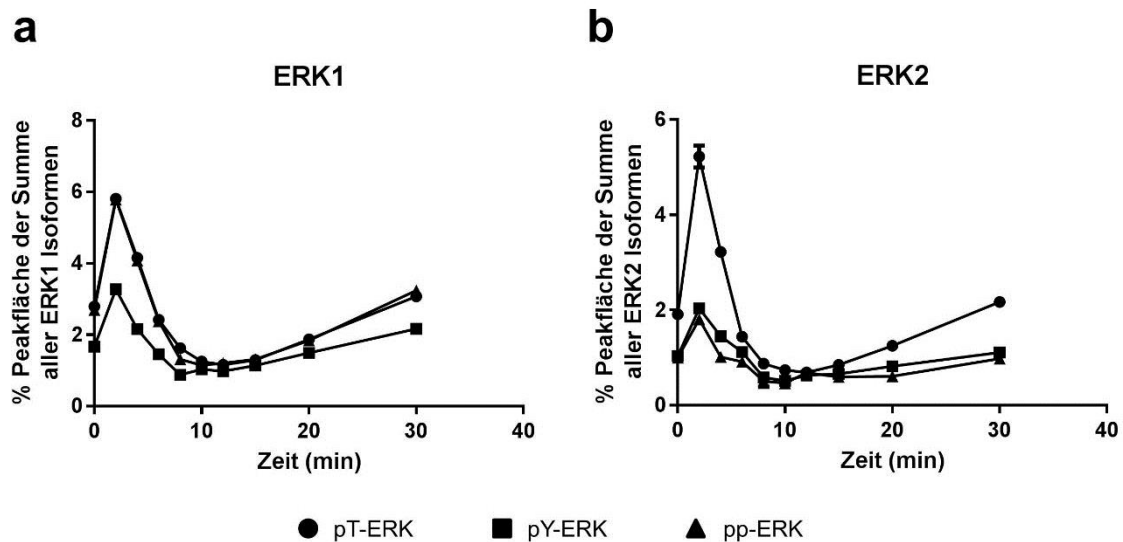


Abbildung 14: Kinetik der ERK1/2-Aktivierung in MCP-1-stimulierten THP-1-Zellen mit Differenzierung der monophosphorylierten Isoformen.

THP-1-Zellen wurden mit 100 ng/ml MCP-1 für unterschiedliche Zeiten inkubiert (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30 min). Die Zelllysate wurden anschließend im CIEF-Immunoassay mit einem anti-pan-ERK1/2-Antikörper (PS#040-477) analysiert. Die relativen Häufigkeiten (Mittelwert \pm SD von technischen Duplikaten) von mono- und diphosphoryliertem ERK1 (a) und ERK2 (b) sind jeweils in Prozent der gesamten ERK1- bzw. ERK2-Signale gezeigt. Punkte repräsentieren Threonin-monophosphoryliertes ERK1/2, Quadrate das Tyrosin-monophosphorylierte ERK1/2 und Dreiecke die diphosphorylierte ERK1/2-Isoform. Es ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

3.7.3 Stimulation von humanen PBMCs mit NMDA

Im nächsten Schritt wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) aus Vollblut von zwei gesunden Freiwilligen isoliert. Die Zellen wurden mit NMDA in der Gegenwart von Glycin stimuliert und die Lysate mit dem CIEF-Immunoassay analysiert (Abbildung 15). 4 min nach Zugabe von NMDA wurde für pY-ERK1 ein Maximum von ungefähr 2 % beobachtet (Abbildung 15a und c). Der relative Anteil von pY-ERK2 war deutlich niedriger und erreichte sein Maximum nach 4 minütiger NMDA-Behandlung in Donor A (Abbildung 15b) und nach 2 minütiger Behandlung in Donor B (Abbildung 15d). Die maximalen Signale von pp-ERK1 (5-7 %) und pp-ERK2 (5-6 %) wurden 4 min nach NMDA-Zugabe detektiert und erreichten zu diesem Zeitpunkt eine höhere Abundanz als pY-ERK1/2 und pT-ERK1/2. Das doppel-phosphorylierte pp-ERK1 nahm anschließend schnell ab und war 15 min nach NMDA-Zugabe wieder nahe am Anfangswert (Abbildung 15a und c). Im Gegensatz dazu konnte für pp-ERK2 ein leichter biphasischer Zeitverlauf in beiden Spendern beobachtet werden, welcher ein Minimum nach 8 min aufwies, gefolgt von einem weiteren Anstieg (Abbildung 15b und d). Die Threonin-monophosphorylierten Isoformen pT-ERK1 und pT-ERK2 erreichten ihre Maxima nach etwa 4-8 min gefolgt

von einem vergleichsweise langsamen Rückgang. Monophosphoryliertes pT-ERK1 und pT-ERK2 zeigten deutlich höhere relative Häufigkeiten in stimulierten PBMCs als pY-ERK1 bzw. pY-ERK2.

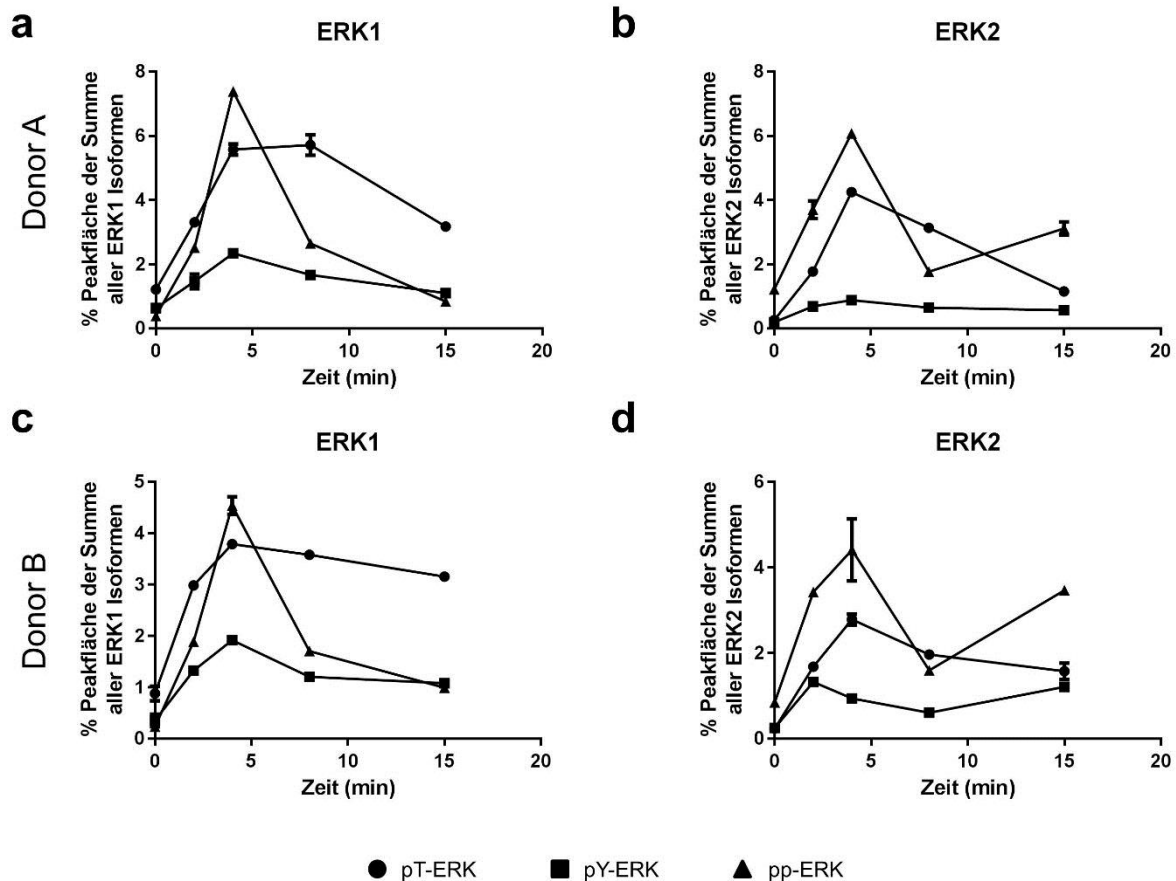


Abbildung 15: Zeitliche Aktivierung von NMDA-stimulierten PBMCs mit zusätzlicher Differenzierung der monophosphorylierten ERK1/2-Isoformen.

PBMCs aus humanem Vollblut wurden mit 50 μM NMDA in Kombination mit 10 μM Glycin für unterschiedliche Zeitpunkte (0, 2, 4, 8, 15 min) behandelt, lysiert und im CIEF-Immunoassay mit einem anti-pan-ERK1/2-Antikörper #040-474 (ProteinSimple) analysiert. Die relativen Häufigkeiten (Mittelwert \pm SD von technischen Duplikaten) von mono- und diphosphoryliertem ERK1 (a+c) und ERK2 (b+d) sind in Prozent der gesamten ERK1- bzw. ERK2-Signale gezeigt. (a+b) gehören zu Donor A und (c+d) gehören zu Donor B. Punkte repräsentieren Threonin-monophosphoryliertes ERK1/2, Quadrate das Tyrosin-monophosphorylierte ERK1/2 und Dreiecke das diphosphorylierte ERK1/2. Abbildung verändert nach Kraus *et al.*, 2015.

3.8 Pilot-Studie zur Kinetik der ERK1/2-Phosphorylierung in PBMCS

Die bisher etablierten technischen Schritte bis hin zur Unterscheidung der monophosphorylierten ERK1/2-Isoformen, wurden schließlich in einer kleinen Pilot-Studie mit einer klinischen Kohorte exemplarisch angewandt. Dabei wurde untersucht, ob die vorgestellte Methode geeignet ist, um unter Routinebedingungen den zeitlichen Verlauf von Phosphorylierung und Dephosphorylierung von ERK1 und ERK2 in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Probanden mit Alzheimer-

Demenz, nicht-dementen Patienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen und nicht-dementen Kontrollprobanden zu analysieren. Auf diese Weise sollte weiterhin nach Hinweisen auf mögliche Veränderungen der ERK1/2-Signalkaskade in der Peripherie gesucht werden, wie sie in Fibroblasten von Alzheimerpatienten bereits beschrieben worden ist (Zhao *et al.*, 2002).

Diese orientierende Pilot-Studie wurde am Universitätsklinikum Ulm in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Markus Otto durchgeführt. Es wurden PBMCs von ausgewählten Probanden untersucht, welche in vier diagnostische Gruppen eingeteilt werden konnten:

- Alzheimer-Demenz (AD, $n = 5$)
- Leichte kognitive Einschränkungen (MCI, $n = 3$)
- Amyotrophe Lateralsklerose (ALS, $n = 4$)
- Nicht-demente Kontrollen (ND, $n = 7$)

Entsprechend den Vorversuchen wurden die PBMCs aus Vollblut der Probanden isoliert, mit NMDA in Kombination mit Glycin für unterschiedliche Inkubationszeiten stimuliert und die Lysate im CIEF-Immunoassay analysiert.

3.8.1 Beschreibung der Daten aus der klinischen Kohorte und Vergleich mit den Daten aus den Vorversuchen

Die aufgezeichneten Elektropherogramme zeigten auffällige Unterschiede zu denen aus den Vorversuchen zur Assay-Etablierung in PBMCs. Zusätzlich zu den, wie oben im Einzelnen beschriebenen, acht eindeutig zugeordneten Signalen (ERK1, ERK2, pT-ERK1, pT-ERK2, pY-ERK1, pY-ERK2, pp-ERK1, pp-ERK2) wurden weitere relativ starke Signale unbekanntes Ursprungs im CIEF-Immunoassay beobachtet. Abbildung 16a zeigt ein exemplarisches Elektropherogramm, in dem diese Zusatzsignale gelb markiert sind. Analoge Peaks waren im Rahmen der Vorversuche in einigen der Probanden ebenfalls sichtbar gewesen, fielen in den meisten Fällen aber geringer aus. Bei den Probanden der Pilot-Studie überstiegen diese Signale die meisten phospho-ERK1/2-Peaks um ein Vielfaches. Insbesondere das Signal mit einem pI von 6,06 war im Großteil der Probanden aus der Ulmer Kohorte stark erhöht. Das Signal bei pI 6,75 war bei diesen Probanden ebenfalls sehr hoch, in den Experimenten zur Assay-Etablierung war es lediglich in einzelnen Fällen in stärkerer

Ausprägung sichtbar gewesen. Diese zusätzlichen Peaks wurden im CIEF-Immunoassay nicht von den Antikörpern CS#4370 und CS#4377 gegen phosphorylierte Formen von ERK1/2 erkannt, sodass sie bei den Auswertungen zur Kinetik der ERK1/2-Aktivierung im Weiteren nicht berücksichtigt wurden. Auffällige Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen hinsichtlich des Auftretens dieser zusätzlichen Signale wurden nicht beobachtet.

Abbildung 16b und c zeigen repräsentativ für eine nicht-demente Kontrolle die Kinetik der ERK1- und ERK2-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung, inklusive des Zeitpunktes 4 min, welcher in Abbildung 16a als Elektropherogramm dargestellt ist. Im Vergleich zu den beiden gezeigten Proben, die in den Vorversuchen analysiert worden waren (Abbildung 15), fiel der Anteil der doppelt-phosphorylierten Form von ERK1 zu allen untersuchten Zeitpunkten in den Probanden aus der klinischen Kohorte deutlich geringer aus. Als dominierende phospho-ERK1-Isoform wurde hier die Threonin-monophosphorylierte Variante pT-ERK1 identifiziert. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus den Vorversuchen, wies pY-ERK1 zu allen Zeitpunkten eine geringe Abundanz auf. Auch hinsichtlich der Verteilung der ERK2-phospho-Formen waren auffällige Unterschiede zu den Vorversuchen festzustellen. Während in den gesunden Probanden im Rahmen der Assay-Etablierung pp-ERK2 als dominante Isoform nach NMDA-Stimulation beschrieben werden konnte, zeigte es in den klinischen Proben aus Ulm nahezu keinen Anstieg nach Behandlung mit NMDA. Hier konnte pT-ERK2 als Isoform mit der höchsten Abundanz identifiziert werden, welche eine Phosphorylierungskinetik analog zu den Vorversuchen zeigte. Aufgrund der schwachen Signale von pp-ERK2 und pY-ERK2, die zudem von angrenzenden unbekanntem Signalen (s.o.) überlagert wurden, gestaltete sich die Analyse dieser beiden phospho-Formen als schwierig.

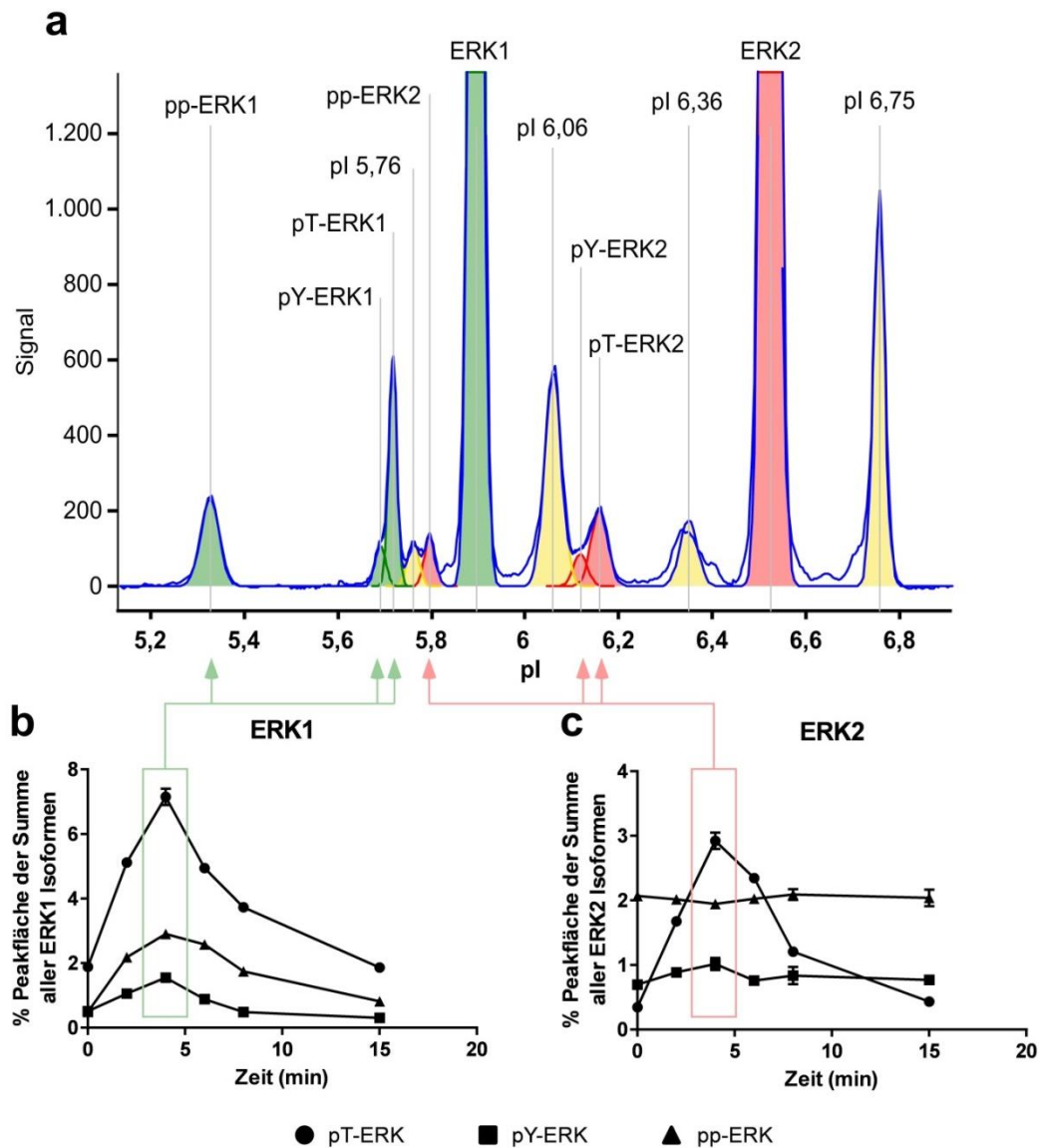


Abbildung 16: Elektropherogramm zur Verdeutlichung der Signalausprägung und repräsentative Kinetik der Phosphorylierung innerhalb der Pilot-Studie.

PBMCs wurden mit 50 μM NMDA in Kombination mit 10 μM Glycin für 0, 2, 4, 6, 8 und 15 min behandelt, anschließend lysiert und im CIEF-Immunoassay mit einem anti-pan-ERK1/2-Antikörper analysiert. (a) zeigt ein repräsentatives Elektropherogramm einer nicht-dementen Kontrolle nach 4 min Stimulation. Die Signale der verschiedenen ERK1-Isoformen sind grün unterlegt, die der ERK2-Isoformen rot. Unbekannte Signale sind gelb markiert und mit ihrem entsprechenden pI-Wert benannt. Das Elektropherogramm zeigt eine Ausschnittsvergrößerung mit Fokus auf die niedrigen Signale, sodass die Signale von unphosphoryliertem ERK1 und ERK2 nicht vollständig abgebildet sind. Die relativen Häufigkeiten (Mittelwert \pm SD von technischen Duplikaten) von mono- und diphosphoryliertem ERK1 (b) und ERK2 (c) sind jeweils in Prozent aller identifizierten ERK1- bzw. ERK2-Signale für den gesamten zeitlichen Verlauf in dieser Probe aus der Kontrollgruppe gezeigt. Punkte repräsentieren Threonin-monophosphoryliertes ERK1/2, Quadrate das Tyrosin-monophosphorylierte ERK1/2 und Dreiecke die diphosphorylierte ERK1/2-Isoform.

3.8.2 Vergleich des zeitlichen Verlaufs der ERK1- und ERK2-Phosphorylierung in den untersuchten diagnostischen Gruppen

Der zeitliche Verlauf des Auftretens und des relativen Anteils der 6 identifizierten ERK1/2-phospho-Formen zu jedem gewählten Zeitpunkt in allen vier untersuchten

diagnostischen Gruppen nach Zugabe von NMDA zu den PBMCs ist in Abbildung 17 zusammengefasst. Wie bereits in Abbildung 16 repräsentativ für einen Probanden gezeigt, waren in allen Gruppen die beobachteten Werte für pY-ERK1 zu allen Zeitpunkten niedrig und zeigten nur geringe zeitliche Veränderungen oder Schwankungen. Auch pY-ERK2 zeigte bei geringer Abundanz kaum Unterschiede zwischen den Gruppen, allerdings wies diese Isoform im Vergleich zu pY-ERK1 deutlich höhere Varianzen auf, insbesondere in der Kontrollgruppe. Wie bereits beschrieben zeigte pp-ERK2 nahezu keinen zeitabhängigen Anstieg und in allen untersuchten Gruppen wurde ein ähnlicher Zeitverlauf beobachtet. Des Weiteren wurden insbesondere die Signale von pY-ERK2 und pp-ERK2 von angrenzenden unbekanntem Signalen überlagert, was zu der erhöhten Varianz führte und die Analyse erschwerte (siehe Abschnitt 3.8.1). Für die Varianten pp-ERK1, pT-ERK1 und pT-ERK2 konnte in allen Gruppen eine zeitabhängige Zu- und nachfolgende Abnahme ihrer prozentualen Flächenanteile beobachtet werden. Hier schienen sich mögliche Gruppenunterschiede anzudeuten.

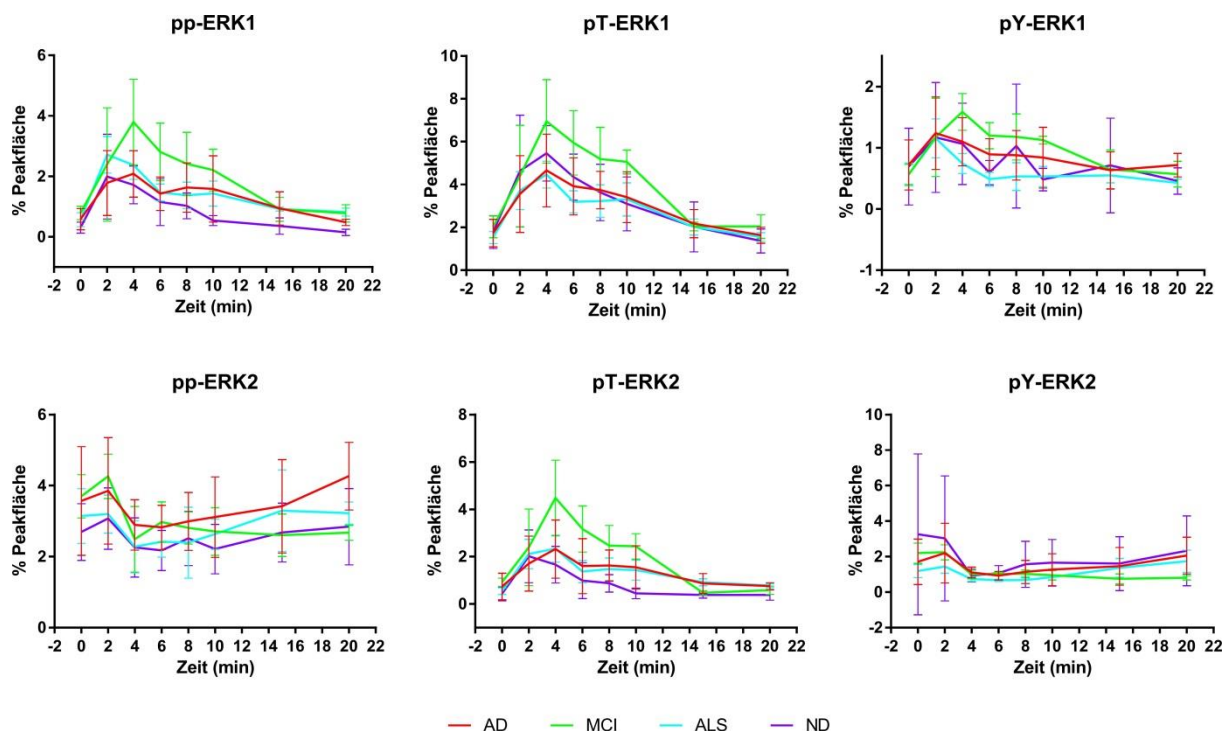


Abbildung 17: Vergleich des zeitabhängigen Auftretens der phospho-Isoformen von ERK1 und ERK2 in den untersuchten diagnostischen Gruppen.

Nach der Stimulation der PBMCs mit NMDA für unterschiedliche Inkubationszeiten und der Analyse im CIEF-Immunoassay mit einem anti-pan-ERK1/2-Antikörper wurden aus den Elektropherogrammen die prozentualen Flächenanteile jeder ERK1/2-phospho-Isoform in Bezug auf die Summe der Flächen aller identifizierten ERK1- bzw. ERK2-Signale berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der genannten Varianten für jede der untersuchten diagnostischen Gruppen.

3.8.3 Statistische Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung durch definierte Parameter

Im Folgenden wurden einzelne Parameter in der ERK1/2-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung nach Zugabe von NMDA näher untersucht, um eventuell vorhandene Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen herauszuarbeiten. Die nachfolgend beschriebene Auswertung umfasst drei definierte Analyseparameter, die den kinetischen Verlauf in einfacher und vergleichbarer Form näher charakterisieren sollten und welche schematisch anhand einer Beispielkurve in Abbildung 18a dargestellt sind. Die Analyse wurde für die drei ERK1-phospho-Formen, sowie für pT-ERK2, durchgeführt. Die Signale von pp-ERK2 und pY-ERK2 wiesen aufgrund der Überlagerung mit den unbekanntenen Signalen und ihrer geringen Abundanz zu hohe Varianzen auf. Die Ergebnisse sind jeweils für die beiden Isoformen pp-ERK1 und pT-ERK1 dargestellt, bei denen statistisch signifikante Gruppenunterschiede ermittelt wurden.

Zunächst wurde der relative Flächenanteil beider Varianten an der Summe der Flächen aller ERK1-Signale vor der Zugabe von NMDA verglichen (Abbildung 18b). Zwei der insgesamt sieben Probanden aus der ND-Gruppe zeigten auffällig niedrige Anteile an pp-ERK1. Insgesamt zeichneten sich aber sowohl für pp-ERK1 als auch für pT-ERK1 keine auffälligen Gruppenunterschiede zu diesem Zeitpunkt ($t = 0$ min) ab.

Um die maximale Zunahme der einfachen und doppelten Phosphorylierung nach Zugabe von NMDA zu erfassen, wurde für die einzelnen Isoformen der maximal nach Stimulation erreichte relative Flächenanteil zum Signal bei $t = 0$ min in % berechnet (Abbildung 18c). In der ND-Gruppe wurde im Vergleich zur AD-Gruppe eine deutlich stärkere Zunahme von pp-ERK1 nach NMDA-Stimulation beobachtet. Der Unterschied zwischen diesen beiden diagnostischen Gruppen erreichte statistische Signifikanz ($P < 0,05$) mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn's-Zweitest für multiple Vergleiche. Aufgrund der sehr kleinen untersuchten Stichprobe sind diese Beobachtungen als vorläufig einzustufen. Hinsichtlich der maximalen Zunahme der einfach-phosphorylierten Variante pT-ERK1 nach NMDA-Stimulation wurden keine auffälligen Gruppenunterschiede festgestellt. Die maximale einfache oder zweifache Phosphorylierung wurde mit wenigen Ausnahmen 2 oder 4 min nach Gabe des Stimulus erreicht, auffällige Unterschiede

zwischen den diagnostischen Gruppen wurden diesbezüglich nicht festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Um weiterhin die Dephosphorylierung durch Phosphatasen nach Erreichen des maximalen Phosphorylierungsgrades zu erfassen, wurde für jede Probe der relative Anteil jeder phospho-Isoform 15 min nach Stimulationsbeginn zum erreichten prozentualen Maximalwert ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 18d). Ein Vergleich der untersuchten diagnostischen Gruppen zeigte, dass pp-ERK1 in der Kontrollgruppe (ND) nach Erreichen des Maximums anscheinend schneller dephosphoryliert wurde als in den AD- und ALS-Patienten. Diese Gruppenunterschiede zum Zeitpunkt $t = 15$ min erreichten statistische Signifikanz ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn's-Zweitest für multiple Vergleiche). Weiterhin schien auch die Dephosphorylierung von pT-ERK1 nach Erreichen des maximalen Anteils in der ND-Gruppe schneller zu erfolgen als in der AD- und ALS-Gruppe. Statistische Signifikanz ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn's-Zweitest für multiple Vergleiche) wurde hier allerdings nur erreicht, nachdem ein einzelner Wert in der ND-Gruppe, der mit dem Grubbs-Outlier-Test als „Ausreißer“ identifiziert worden war, aus der Statistik ausgeschlossen wurde (Abbildung 18d, rote Markierung). Aufgrund der sehr kleinen untersuchten Fallzahl sind die beschriebenen Beobachtungen als vorläufig zu betrachten.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den vier untersuchten diagnostischen Gruppen hinsichtlich der Veränderungen der relativen Anteile an pT-ERK2 für die definierten Analyseparameter wurden nicht festgestellt. Die Dephosphorylierung der einzelnen ERK1/2-phospho-Isoformen nach Erreichen des jeweiligen maximalen Phosphorylierungsgrades wurde auch für andere Zeitpunkte berechnet und verglichen (8 min, 10 min und 20 min). Allerdings wurden zu keinem weiteren Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede für die verschiedenen Isoformen zwischen den diagnostischen Gruppen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

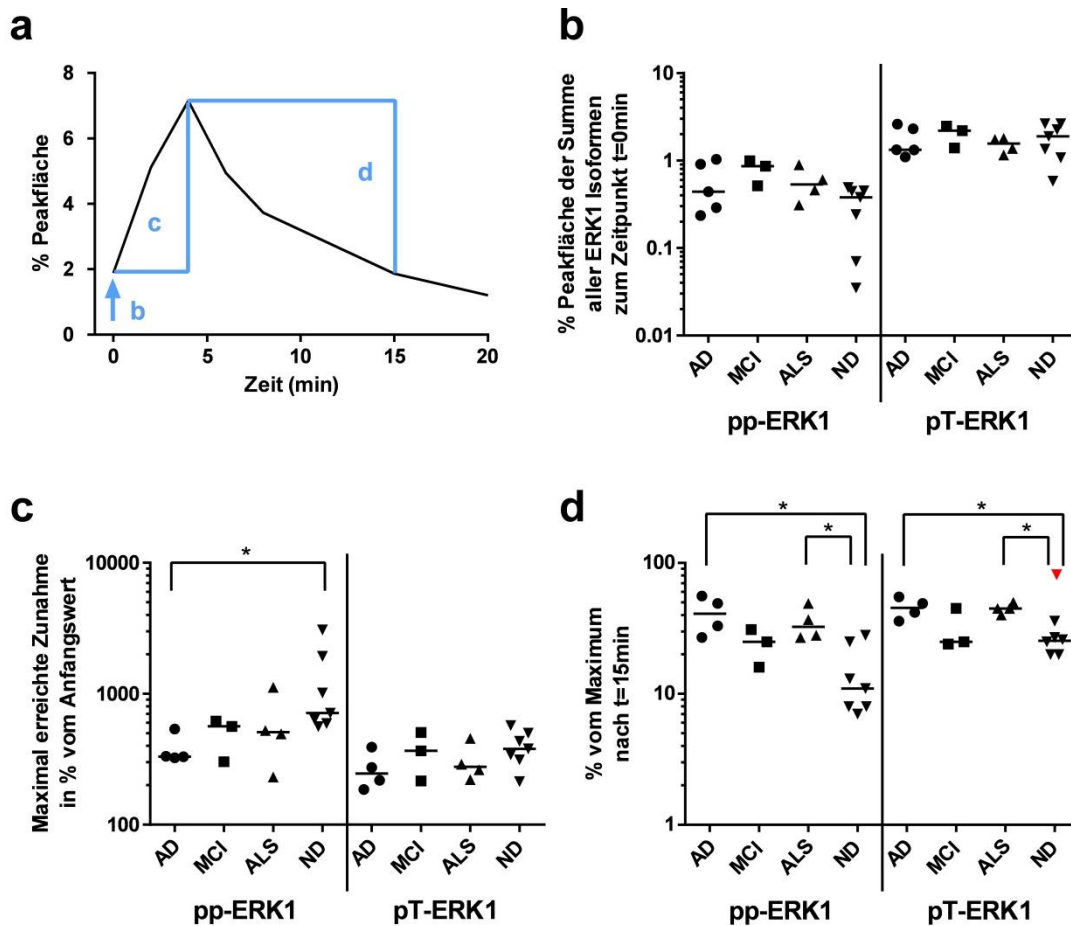


Abbildung 18: Vergleichende Analyse zur zeitabhängigen Phosphorylierung von ERK1 in biologischen Proben im Rahmen einer Pilot-Studie.

PBMCs wurden mit 50 μ M NMDA in Kombination mit 10 μ M Glycin für unterschiedliche Inkubationszeiten behandelt, anschließend lysiert und im CIEF-Immunoassay mit einem anti-pan-ERK1/2-Antikörper analysiert. Die Scatterplots zeigen ausgewählte Aspekte der ERK1-Phosphorylierung in jeweils 4 diagnostischen Gruppen (AD, MCI, ALS, ND) für die Isoformen pp-ERK1 und pT-ERK1. Es ist jeweils der Median für die angegebene phospho-Isoform in jeder diagnostischen Gruppe eingezeichnet. (a) Schematische Darstellung der im weiteren Verlauf analysierten Parameter anhand einer Beispielkurve. Erklärung zur Berechnung der Parameter in der Beschreibung der einzelnen Teilbilder. (b) Prozentualer Anteil der jeweiligen phospho-Isoform an der Summe der Flächen aller ERK1-Isoformen vor Beginn der Stimulation. (c) Maximale Phosphorylierung (unabhängig vom Zeitpunkt) im Verhältnis zur Phosphorylierung vor Beginn der Stimulation (Anfangswert), berechnet aus den relativen Flächeninhalten. Der prozentuale Flächenanteil jeder phospho-Isoform zum Zeitpunkt 0 min stellt dabei 100 % dar und der Anteil dieser phospho-Isoform zum Zeitpunkt ihrer maximalen Phosphorylierung wurde dazu ins Verhältnis gesetzt. (d) Verhältnis des Grades der Phosphorylierung zum Zeitpunkt 15 min in Bezug auf die maximale Phosphorylierung. Der maximal erreichte prozentuale Flächenanteil jeder phospho-Isoform stellt dabei 100 % dar und der Anteil dieser phospho-Isoform 15 min nach Stimulationsbeginn wurde dazu ins Verhältnis gesetzt. Die statistischen Signifikanzen wurden durch den nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Zweitest für multiple Vergleiche errechnet. *: $P < 0,05$. Nicht für jeden Probanden war jeder Datenpunkt verfügbar. Der rotmarkierte Wert wurde auf der Basis von Grubbs-Ausreißer-Test ($\alpha = 0,05$) aus der Statistik ausgeschlossen.

4 Diskussion

Die detaillierte Studie der zellulären Aktivierung und Inaktivierung der ERK1/2 MAP Kinasen durch duale Phosphorylierung und Dephosphorylierung am konservierten TEY-Aktivierungsmotiv wird bisher oft mittels Western Blotting oder verschiedenen Enzyme-Linked-Immunsorbent (ELISA)-Assays durchgeführt. Allerdings werden dazu spezifische phosphorylierungssensitive Antikörper benötigt, was quantitative Vergleiche der relativen Häufigkeit der verschiedenen Formen erschwert. In einer kürzlich erschienenen Publikation haben Prabakaran und Kollegen eine anspruchsvolle, kombinierte Massenspektrometrie (MS)-Strategie präsentiert. Hierbei war es möglich, die Verteilung der phospho-Formen von mehrfach phosphorylierten zellulären Proteinen, inklusive ERK2, auch ohne den Einsatz eines spezifischen Antikörpers zu quantifizieren (Prabakaran *et al.*, 2011). Im Vergleich dazu repräsentiert die hier angewandte isoelektrische Fokussierung in Mikrokapillaren gefolgt von fotochemischer Immobilisierung und immunologischem Nachweis mit chemilumineszenter Detektion einen hochsensitiven Ansatz, welcher darüber hinaus auch einen erhöhten Probendurchsatz erlaubt. Zusätzlich ermöglicht die Verwendung eines einzigen pan-spezifischen und phosphorylierungsinsensitiven anti-ERK1/2-Antikörpers die direkte relative semi-Quantifizierung von diphosphorylierten, monophosphorylierten und unphosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2 (O'Neill *et al.*, 2006).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein geeignetes Arbeitsprotokoll entwickelt, um die Phosphorylierung von ERK1/2 mit dem CIEF-Immunoassay in experimentellen Modellen in unserem Labor zu analysieren. Hierfür wurden verschiedene Versuchsbedingungen optimiert und die technische Varianz überprüft. Als wichtige Weiterentwicklung der bisher publizierten analytischen Möglichkeiten des verwendeten CIEF-Immunoassays gelang im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit die zusätzliche Unterscheidung und eindeutige Zuordnung von Threonin-monophosphoryliertem und Tyrosin-monophosphoryliertem ERK1 und ERK2. Die Verwendung eines einzigen pan-spezifischen anti-ERK1/2-Antikörpers ermöglichte dabei direkte relative Vergleiche der Häufigkeit der verschiedenen Formen von ERK1 und ERK2 in der untersuchten Probe. Die Reproduzierbarkeit der relativen Quantifizierungen erwies sich für solche Signale als akzeptabel (Variationskoeffizient < 15 %), deren relativer Flächeninhalt (AUC) mindestens 1 % der aufsummierten Flächeninhalte aller ERK1- bzw. ERK2-Signale betrug. Im

zweiten Teil der Arbeit wurden verschiedene Zelllinien als Modelle eingesetzt, um die Anwendbarkeit der Methode in der Praxis zu prüfen und die Kinetik der ERK1/2-Phosphorylierung nach Gabe eines Stimulus zeitabhängig zu untersuchen. Spezieller Fokus lag dabei auf der Differenzierung der einzelnen phosphorylierten Isoformen inklusive der zusätzlichen Unterscheidung der beiden monophosphorylierten Isoformen von ERK1 und ERK2. Nachdem die etablierte Methode erfolgreich auch auf humane PBMCs übertragen werden konnte, wurde abschließend die Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung in diesen Zellen im Rahmen einer Pilot-Studie mit einer klinischen Kohorte umgesetzt. Hierbei sollte die Frage untersucht werden, ob sich möglicherweise Hinweise auf krankheitsassoziierte Veränderungen in der ERK1/2-Signalkaskade beobachten ließen, wie sie bereits in Fibroblasten von AD-Patienten gezeigt werden konnten (Zhao *et al.*, 2002).

4.1 Optimierung der Analysebedingungen für ERK1 und ERK2 MAP

Kinasen für den CIEF-Immunoassay

Bestmögliche Versuchsbedingungen sind essentiell für eine hochsensitive Detektion und vor allem für eine aussagekräftige und reproduzierbare Analyse der vorliegenden Daten. Das gewählte Verfahren erforderte eine Optimierung der Lysebedingungen und eine Prüfung der Signal-Varianzen im CIEF-Immunoassay.

Die am TEY-Motiv phosphorylierten Isoformen von ERK1/2 werden in den Nucleus transloziert (Chen *et al.*, 1992), um dort ihrerseits verschiedene nukleäre Ziele, wie zum Beispiel diverse Transkriptionsfaktoren, zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (Treisman, 1996; Roskoski, 2012). Ein Lysepuffer, der lediglich eine cytoplasmatische Fraktion erzeugt, würde folglich nur einen Teilausschnitt der Verteilung von phospho-ERK1/2 widerspiegeln, da die phosphorylierten Formen im Zellkern von der Analyse ausgeschlossen wären. Aus diesem Grund wurden Lysepuffer mit unterschiedlichen Eigenschaften getestet: ein selbsthergestellter Bicine/CHAPS-Puffer, das M-PER-Reagenz und das NE-PER-Kit.

Das NE-PER-Kit bietet im Prinzip den Vorteil einer Fraktionierung in Cytoplasma und Nucleoplasma. Western Blot-Analysen der erhaltenen Fraktionen zeigten eine saubere Trennung mit äußerst geringer Kreuzkontamination der gewählten Markerproteine für die cytoplasmatische und die nukleäre Fraktion. Des Weiteren

konnte im Western Blot eine relative Anreicherung phosphorylierter Isoformen in der Kernfraktion beobachtet werden. Insgesamt waren die phospho-Signale für ERK1/2 in beiden Fraktionen des NE-PER-Kits allerdings auffällig niedrig. Eine detailliertere Analyse mit dem CIEF-Immunoassay zeigte, dass es sich bei den Isoformen in der Kernfraktion hauptsächlich um pp-ERK1 und pp-ERK2 handelte, was für eine Translokation dieser beiden doppelt-phosphorylierten und damit vollständig aktivierten Varianten in den Kern spricht (s.o.). Wie schon im Western Blot beobachtet, waren auch im CIEF-Immunoassay vor allem die Signale in der Kernfraktion äußerst gering. Es stellte sich heraus, dass ein nach Herstellerangaben in den Puffern des NE-PER-Kits enthaltenes, nicht genau benanntes Reduktionsmittel einen erheblichen Einfluss auf den Nachweis von ERK1/2 zu haben schien und für die geringen Wiederfindungsraten von phospho-ERK1/2, insbesondere von doppelt-phosphoryliertem ERK2, verantwortlich war. Ein ähnlicher Effekt konnte auch durch Zugabe von DTT in mit dem Bicine/CHAPS-Puffer erzeugten Extrakten beobachtet werden und ließ sich somit eindeutig auf das Vorhandensein des Reduktionsmittels zurückführen.

Einige der beobachteten Veränderungen in der Signaldetektion könnten durch eine Reaktivierung von spezifischen Phosphatasen in der Probe durch das Reduktionsmittel hervorgerufen worden sein. Sowohl DTT als auch andere Reduktionsmittel sind in der Lage reversibel oxidativ inhibierte Phosphatasen zu aktivieren. Darunter fallen unter anderem die Serin/Threonin-Protein-Phosphatase 2A (PP2A) (Foley *et al.*, 2004), die an der Dephosphorylierung von pT-ERK2 beteiligt ist (Zhou *et al.*, 2002), sowie verschiedene Protein-Tyrosin-Phosphatasen wie beispielsweise die hämatopoetische Tyrosin-Phosphatase (HePTP) (Parsons und Gates, 2013), welche ebenfalls effektiv pp-ERK2 und pY-ERK2 dephosphorylieren kann (Zhou *et al.*, 2002). Die Aktivierung verschiedener Phosphatasen könnte demnach an der beschriebenen Verstärkung der Signale von monophosphoryliertem und unphosphoryliertem ERK2 beteiligt gewesen sein. Allerdings stand die Signalverstärkung des monophosphorylierten ERK2-Peaks und des unphosphorylierten ERK2-Peaks nicht im entsprechenden Verhältnis zur Abnahme des Signals von diphosphoryliertem ERK2. Das Reduktionsmittel DTT schien folglich noch weitere Einflüsse auf die Detektion von ERK2 mit dem CIEF-Immunoassay zu haben, während die Signale von ERK1 nahezu unverändert blieben.

Da sowohl die genaue Zusammensetzung der Puffer im NE-PER-Kit als auch das enthaltene Reduktionsmittel unbekannt sind, können die Einflüsse auf die ERK1/2-Detektion mit dem CIEF-Immunoassay nicht exakt eingeschätzt werden. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Experimente das M-PER-Reagenz als Lysepuffer gewählt, welches eine effiziente Extraktion von cytoplasmatischen und nukleären Proteinen in einer einzigen Fraktion ermöglicht und direkt mit dem CIEF-Immunoassay kompatibel ist. Im Vergleich zu dem ebenfalls getesteten Bicine/CHAPS-Puffer wurden bessere Ausbeuten des nukleären Markerproteins Fibrillarin beobachtet, woraus geschlossen werden kann, dass es vermutlich ein vollständigeres Gesamtbild in Bezug auf die ERK1/2-phospho-Form-Verteilung bietet.

Die Verwendung eines pan-spezifischen anti-ERK1/2-Antikörpers im CIEF-Immunoassay ermöglicht semi-quantitative Analysen der relativen Häufigkeit der verschiedenen Formen von ERK1 und ERK2 innerhalb einer Probe. Dazu wird der Flächeninhalt (AUC) jeder detektierten Isoform von ERK1/2 in % der aufsummierten Flächeninhalte aller Varianten von ERK1 bzw. ERK2 berechnet. Als wichtiges Qualitätskriterium für analytische Testverfahren wurde die Reproduzierbarkeit dieser semi-quantitativen Auswertungen untersucht. Der Variationskoeffizient (% CV) innerhalb eines Assays für die monozytäre THP-1-Zelllinie lag nach Stimulation der Zellen bei maximal 6 % und selbst in unstimulierten Zellen lag die höchste Streuung bei lediglich 7,5 % CV für pp-ERK2. Die Intraassayvarianz der verschiedenen ERK1/2-Formen wurde parallel auch für humane PBMCs ermittelt, welche in diesem speziellen Experiment allerdings nur gering auf die Stimulation reagierten. Diese Zellen wurden einen Tag länger in Kultur gehalten, als die PBMCs der anderen gezeigten Experimente, was möglicherweise einen Einfluss auf die Aktivierbarkeit von ERK1/2 hatte. In den nicht-aktivierten PBMCs waren die Schwankungen zwischen den technischen Replikaten zum Teil deutlich höher, insbesondere für die phospho-ERK1/2-Signale, die nur knapp über dem Hintergrund lagen. In stimulierten PBMCs konnte eine akzeptable Reproduzierbarkeit der relativen Quantifizierungen mit niedrigen Variationskoeffizienten für die Isoformen pp-ERK1, pT-ERK1, pY-ERK1, pp-ERK2 und pT-ERK2 von unter 12 % innerhalb eines Assays ermittelt werden. Lediglich die Streuung der relativen Häufigkeit von pY-ERK2 lag in diesem Fall bei 24 % CV. Es handelte sich hierbei allerdings um eine nur in sehr geringen Mengen vorhandene Isoform in diesen Zellen. Auch in THP-1-Zellen schienen pY-

ERK1 und pY-ERK2 unterrepräsentierte Isoformen unter den gewählten Bedingungen darzustellen. Allerdings waren hier die Messabweichungen geringer, da in dieser Zelllinie niedrigere Hintergrundsignale auftraten als in den PBMCs, welche den Variationskoeffizienten besonders für niedrige Signale beeinflussen können. Des Weiteren ist im Falle der aus humanen Blutproben isolierten PBMCs stets mit probandenabhängigen interindividuellen Schwankungen zu rechnen. Auch die Streuungen zwischen unterschiedlichen Läufen (Interassayvarianz) waren in aktivierten PBMCs mit % CV-Werten von unter 7 % in einem Bereich, der einen aussagekräftigen Vergleich von Proben aus verschiedenen CIEF-Immunoassays erlaubte. Auch hier waren die Abweichungen bei nicht-aktivierten Zellen höher als nach Stimulation, da unter Kontrollbedingungen die phospho-ERK1/2-Signale sehr klein waren und nur knapp über dem Hintergrundrauschen lagen.

Zusammengenommen lassen die ermittelten Variationskoeffizienten für die relativen Quantifizierungen sowohl einen Vergleich von verschiedenen Proben innerhalb eines Laufes zu als auch einen Vergleich zwischen mehreren voneinander unabhängigen Läufen. Dabei lagen die Variationskoeffizienten im Allgemeinen in einem akzeptablen Bereich, sobald die Flächeninhalte der Signale der einzelnen Isoformen mindestens 1 % der Gesamtmenge aller ERK1- oder ERK2-Isoformen ausmachten. Bei manchen Isoformen genügten bereits relative Flächenanteile von 0,5 % für eine akzeptable technische Streuung. Im Vergleich zu den Streuungen der relativen Flächeninhalte fielen Intra- und Interassayvarianzen der absoluten Peakflächen deutlich höher aus, weshalb sie für quantitative Vergleiche im Weiteren nicht berücksichtigt wurden. Dementsprechend wurde kein Housekeeping-Protein als Ladekontrolle in jeder Kapillare zur Normalisierung benötigt, da eine semi-quantitative Analyse bereits auf Basis der relativen Flächeninhalte bei Verwendung eines phosphorylierungsinsensitiven anti-pan-ERK1/2-Antikörpers geschehen konnte.

4.2 Eindeutige Identifizierung von pT- und pY-ERK1/2 durch kompetitive Blockierung

Da die monophosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2 in den CIEF-Elektropherogrammen regelmäßig als Doppelpeaks auftauchten, wurden die zugrunde liegenden Ladungs-Isoformen von monophosphoryliertem ERK1 und ERK2

näher charakterisiert und aufgeklärt. Der kombinierte Einsatz von drei verschiedenen, kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen phosphoryliertes ERK1/2 und einer Serie von synthetischen phospho-Peptiden in kompetitiven Blockierungsexperimenten ermöglichte die Identifizierung und eindeutige Zuordnung der Threonin- und Tyrosin-monophosphorylierten Isoformen pT-ERK1, pY-ERK1, pT-ERK2 und pY-ERK2. Dieser Nachweis gelang sowohl in Lysaten von stimulierten Zellen der monozytären THP-1- und Neuroblastom-SH-SY5Y-Zelllinie, als auch in Zelllysaten von stimulierten humanen PBMCs isoliert aus Vollblut.

Alle drei getesteten anti-phospho-ERK1/2-Antikörper wurden dabei kompetitiv von einem synthetischen pp-Peptid blockiert, welches sowohl am Threonin als auch am Tyrosin des beinhalteten TEY-Aktivierungsmotivs phosphoryliert war. Das entsprechende monophosphorylierte pT-Peptid blockierte die Erkennung von mono- und diphosphoryliertem ERK1/2 durch den Antikörper #4370, während das pY-Peptid die Detektion von mono- und diphosphoryliertem ERK1/2 durch die Antikörper #4377 und #040-477 verhinderte. Zusammengenommen weisen die Beobachtungen aus den kompetitiven Blockierungsexperimenten darauf hin, dass alle drei getesteten Antikörper phospho-ERK1/2 nur dann erkennen, wenn es entweder am Threoninrest (Antikörper #4370) oder am Tyrosinrest (Antikörper #4377 und #040-477) phosphoryliert vorliegt, unabhängig vom Phosphorylierungs-Status der verbleibenden, zweiten Phosphorylierungs-Stelle innerhalb des TEY-Motivs. Keiner der getesteten anti-phospho-ERK1/2-Antikörper wies eine Spezifität für ausschließlich doppelt phosphorylierte Isoformen auf. Für die Antikörper #4370 und #4377 wurden auf diese Weise die Herstellerinformationen in Bezug auf die Spezifität im zugehörigen Datenblatt bestätigt und darüber hinaus auch ihre Einsatzfähigkeit im CIEF-Immunoassay nachgewiesen.

Die hier vorgestellten Resultate ermöglichen folglich eine eindeutige Detektion von 8 verschiedenen ERK-Signalen mit dem CIEF-Immunoassay bei Verwendung eines einzigen pan-spezifischen Antikörpers in aktivierten Zellen und eine unzweifelhafte Zuordnung dieser Signale zu unphosphorylierten, Threonin-monophosphorylierten, Tyrosin-monophosphorylierten und diphosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2. Die Möglichkeit, mit dem CIEF-Immunoassay Threonin- und Tyrosin-monophosphorylierte Varianten von ERK1/2 aufgrund von Ladungsunterschieden zu

differenzieren ist neu und erweitert das analytische Spektrum der 2006 von O'Neill *et al.* erstmals vorgestellten Technologie.

4.3 Zeitabhängiges Auftreten von pT- und pY-ERK1/2 in verschiedenen Zelltypen nach unterschiedlichen Stimuli

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von ERK1/2 wurden ausgewählte Zellen mit unterschiedlichen Behandlungssubstanzen zeitabhängig stimuliert. Spezieller Fokus lag dabei auf dem Auftreten der Threonin- und Tyrosin-monophosphorylierten Formen von ERK1 und ERK2.

In SH-SY5Y-Zellen, die mit Bradykinin stimuliert worden waren, konnte eine biphasische Antwort von pp-ERK1, pp-ERK2, pT-ERK1 und pT-ERK2 mit Maxima nach 6-8 und 12 min Inkubationszeit beobachtet werden. Eine ähnliche biphasische ERK1/2-Aktivierung, mit ebenfalls relativ schnellem Zeitverlauf, wurde auch von Asimaki und Kollegen berichtet, nachdem primäre neuronale Telencephalon-Kulturen aus Hühnerembryonen mit dem Cannabinoid-Rezeptor1-Aktivator Methanandamid behandelt worden waren (Asimaki und Mangoura, 2011). Allerdings erlaubte die in der genannten Studie angewandte Western Blot-Analyse keine Differenzierung zwischen monophosphorylierten und diphosphorylierten Formen von ERK1/2.

Die Aktivierung von ERK1 und ERK2 in THP-1-Zellen nach MCP-1-Stimulation wies ihr Maximum für sämtliche Isoformen bereits nach 2 min auf, mit einer darauffolgenden sehr raschen Dephosphorylierung, die nach 10 min ihren Minimalwert erreichte und höchstwahrscheinlich auf die Aktivität von Phosphatasen zurückzuführen ist. Unter den gegebenen Bedingungen wiesen pT- und pp-ERK1 nahezu gleiche relative Abundanzen auf, während pY-ERK1 einen deutlich geringeren Anteil ausmachte. Bei den ERK2-Isoformen zeigte die Threonin-monophosphorylierte Variante pT-ERK2 die höchste Abundanz, allerdings wies auch pp-ERK2 in einem von drei unabhängigen Experimenten einen ähnlichen Anteil auf (Daten nicht gezeigt). Diese Daten weisen Unterschiede zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Jiménez-Sainz auf (Jimenez-Sainz *et al.*, 2003), die ebenfalls THP-1-Zellen mit MCP-1 stimuliert haben. Das Maximum der Aktivierung lag dort erst 3-5 min nach Stimulationsbeginn vor und auch die Dephosphorylierung schien

langsamer zu verlaufen. Die dort angewandte densitometrische Analyse eines Western Blots kann allerdings nicht ohne Weiteres mit den hier vorliegenden Ergebnissen aus dem CIEF-Immunoassay verglichen werden, zumal der Western Blot keine Unterscheidung der verschiedenen phospho-ERK1/2-Isoformen erlaubte. Des Weiteren wurde dort vor der Stimulation über Nacht ein Serumentzug durchgeführt, der ebenfalls Einfluss auf die Phosphorylierungsrate von ERK1/2 haben könnte.

Die hier vorgestellten Vorversuche bezüglich der ERK1/2-Phosphorylierung als Reaktion auf NMDA-Stimulation in PBMCs von zwei unterschiedlichen Spendern zeigten Parallelen zu beiden Zelllinien. Das Maximum für pp-ERK1 und pp-ERK2 wurde 4 min nach Zugabe von NMDA detektiert und nahm danach relativ schnell ab, was höchstwahrscheinlich auf die Aktivität verschiedener Phosphatasen zurückzuführen ist. Der zeitliche Verlauf glich eher der ERK1/2-Aktivierung in MCP-1-behandelten THP-1-Zellen, bei denen das Maximum für alle Isoformen ebenfalls sehr kurz nach Gabe des Stimulus beobachtet werden konnte. Die monophosphorylierten Formen pT-ERK1 und pT-ERK2 zeigten höhere Signale als pY-ERK1 bzw. pY-ERK2 in stimulierten PBMCs, was auch in Bradykinin-behandelten SH-SY5Y-Zellen und MCP-1-behandelten THP-1-Zellen der Fall war. Allerdings zeigten pT-ERK1 und pT-ERK2 hier eine geringfügig länger anhaltende Phosphorylierung im Vergleich zu pp-ERK1 und pp-ERK2, wie es eher in Bradykinin-stimulierten SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die relative Verteilung der untersuchten ERK1/2-phospho-Formen an unterschiedlichen Zeitpunkten möglicherweise erheblich zwischen verschiedenen Zelltypen und möglicherweise auch abhängig vom spezifischen, eingesetzten Aktivator variieren könnte.

Diese Vermutung wird auch durch einen Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche den CIEF-Immunoassay zur ERK1/2-Analyse eingesetzt haben, unterstützt (s.u.). Bei den hier gewählten Zellen und physiologischen Stimuli wurden weitestgehend niedrige Phosphorylierungsraten beobachtet (Summe aller ERK1- bzw. ERK2-phospho-Formen zwischen 10 und 30 %) mit einer eindeutigen Dominanz der Threonin-monophosphorylierten-Isoformen von ERK1 und ERK2 verglichen mit den Tyrosin-monophosphorylierten Varianten. Lediglich nach Behandlung mit dem unphysiologischen Aktivator PMA wurden höhere

Phosphorylierungsraten (insgesamt 50-60 %) sowohl für ERK1 als auch für ERK2 beobachtet, allerdings konnte dabei keine Unterscheidung von pT- und pY-ERK1/2 mehr erfolgen (siehe Abschnitt 3.4).

Humane HAT-29 kolorektale Adenokarzinomazellen zeigten nach Stimulation mit Insulin und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ebenfalls eine Phosphorylierungsrate von je 50-60 % für ERK1 und ERK2 (O'Neill *et al.*, 2006). Die Signale von monophosphoryliertem ERK1 und ERK2 überragten dabei deutlich die der jeweiligen doppelt-phosphorylierten Variante. Allerdings lassen die dargestellten Daten keinen weiteren Schluss auf die prozentuale Verteilung von pT- und pY-ERK1/2 zu.

Im Lungengewebe eines Patienten mit Lungenkrebs konnte eine leichte Dominanz von pp-ERK1 und pp-ERK2 gegenüber den monophosphorylierten Signalen beobachtet werden. Allerdings kann aufgrund des verwendeten anti-pan-ERK1/2-Antikörpers unter Berücksichtigung der hier vorgestellten Peak-Zuordnung nachträglich auf die vermutliche Verteilung der monophosphorylierten Formen geschlossen werden. Wie in den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Zellen schienen auch in den Lungenkrebszellen die Isoformen pT-ERK1 und pT-ERK2 dominanter zu sein als pY-ERK1 und pY-ERK2 (Chen *et al.*, 2013).

In humanen Präadipozyten konnten während der Zelldifferenzierung hohe Phosphorylierungsraten für ERK1 und ERK2 nachgewiesen werden, mit einer klaren Dominanz von pp-ERK1 und pp-ERK2 im Vergleich zu den jeweiligen monophosphorylierten Signalen. Auch für diese Daten kann aufgrund des verwendeten anti-pan-ERK1/2-Antikörpers nachträglich auf die vermutliche Verteilung der monophosphorylierten Isoformen geschlossen werden, da, wie auch in den hier dargestellten Ergebnissen, die monophosphorylierten Signale eindeutig als Doppelpeaks sichtbar waren. Die Tyrosin-monophosphorylierten Isoformen pY-ERK1 und pY-ERK2 schienen dabei einen leicht höheren Anteil als pT-ERK1 und pT-ERK2 aufzuweisen (Johlf's *et al.*, 2015).

Allerdings gibt es auch klare Belege dafür, dass pY-ERK1 und pY-ERK2 in bestimmten Zellen und unter bestimmten Bedingungen sehr häufige Isoformen darstellen können. Hubbard und Kollegen haben mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) stimulierte humane Cal27-Zellen aus der Zunge mit mehreren anti-phospho-ERK1/2-Antikörpern und einem anti-pan-ERK1/2-Antikörper

im CIEF-Immunoassay analysiert (Hubbard *et al.*, 2014). Ausgehend von den hier vorgestellten und bereits publizierten Ergebnissen (Kraus *et al.*, 2015) hinsichtlich der Selektivität des anti-phospho-ERK1/2-Antikörpers CS#4377 im CIEF-Immunoassay, der auch von Hubbard verwendet wurde, können die Daten rückblickend unter einem neuen Aspekt analysiert werden. Obwohl die Signale für ERK1 im Vergleich zu ERK2 äußerst niedrig ausfielen, lagen trotzdem beide MAP Kinasen zum größeren Anteil phosphoryliert vor. Aus den starken Signalen mit dem CS#4377-Antikörper an den pI-Positionen für monophosphoryliertes ERK1 und ERK2 kann dadurch geschlussfolgert werden, dass der größte Anteil der monophosphorylierten Formen offensichtlich als pY-ERK1 und pY-ERK2 vorlag. Diese Ergebnisse unterstützen ebenfalls die Annahme, dass monophosphorylierte ERK-Varianten, die bei physiologischen ATP-Konzentrationen Kinaseaktivität besitzen (Zhou und Zhang, 2002), durchaus eigenständige Funktionen je nach Zelltyp erfüllen könnten.

Monophosphoryliertes ERK2 kann aus der Phosphorylierung durch die hierarchisch übergeordnete Kinase MEK1 resultieren, welche durch einen nicht-prozessiven, distributiven Mechanismus erfolgt (Burack und Sturgill, 1997; Ferrell und Bhatt, 1997). Alternativ kann monophosphoryliertes pT-ERK2 bzw. pY-ERK2 auch durch eine partielle Dephosphorylierung von vollständig aktiviertem, doppel-phosphoryliertem pp-ERK2 durch dualspezifische Threonin/Tyrosin-Phosphatasen, Serin/Threonin- oder Tyrosin-spezifische Phosphatasen generiert werden (Alessi *et al.*, 1995; Saxena *et al.*, 1999; Sohaskey und Ferrell, 1999; Zhou *et al.*, 2002). In den hier vorliegenden Ergebnissen wiesen sowohl in den THP-1-Zellen als auch in den PBMCs die monophosphorylierten Formen, insbesondere die Threonin-monophosphorylierten Varianten, deutlich höhere Abundanzen auf als in der neuronalen Zelllinie SH-SY5Y. Da es sich sowohl bei der THP-1-Zelllinie als auch bei den PBMCs um Zellen aus der Peripherie handelt, die auch für Immunantworten eine Rolle spielen (Tsuchiya *et al.*, 1980; Mandas und Dessi, 2014), und die SH-SY5Y-Zellen neuronalen Ursprungs sind (Biedler *et al.*, 1978), könnte die ERK-phospho-Form-Verteilung einen Hinweis auf die biologische Funktion der Isoformen und damit verbundene zelltypspezifische Reaktionen geben. Die Threonin-monophosphorylierten Formen pT-ERK1 und pT-ERK2 könnten folglich möglicherweise besonders im Rahmen von immunologisch verknüpften Reaktionen eine Rolle spielen.

Die biologische Bedeutung der monophosphorylierten Formen von ERK1/2 ist derzeit noch weitgehend unbekannt, allerdings könnten die monophosphorylierten Formen von ERK2 einen intermediären Aktivierungs-Status repräsentieren, der möglicherweise mit graduierten zellulären Antworten verbunden sein könnte (Zhou und Zhang, 2002). Darauf deutet auch die kristalline Struktur von Tyrosin-monophosphoryliertem ERK1 hin, welche sich von der des diphosphorylierten ERK1 unterscheidet (Kinoshita *et al.*, 2008).

4.4 Pilot-Studie zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung von ERK1/2 in PBMCs von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen

Die im ersten Teil der Arbeit etablierten Parameter und experimentellen Arbeitsschritte wurden schließlich in Form einer kleinen Pilot-Studie an humanen PBMCs einer klinischen Kohorte angewendet. Die Studie sollte dabei einen Überblick über die Anwendbarkeit der Methode unter Routinebedingungen und erste vergleichende Informationen zum zeitlichen Verlauf der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von ERK1/2 in PBMCs von Probanden mit Alzheimer-Demenz, nicht-dementen Patienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen und nicht-dementen Kontrollprobanden geben. Auf diese Weise sollte nach Hinweisen auf mögliche krankheitsassoziierte Veränderungen der ERK1/2-Aktivierung in der Peripherie gesucht werden. Eine verlangsamte Dephosphorylierung von ERK1/2 in Fibroblasten von AD-Patienten wurde bereits 2002 von Zhao *et al.* beobachtet (Zhao *et al.*, 2002). In weiterführenden Studien wurde aufgrund dieser Befunde von der gleichen Arbeitsgruppe ein Verfahren zur Ermittlung der Phosphorylierung in Form des sogenannten „AD-Index“ entwickelt, um Bradykinin-stimulierte Fibroblasten von Patienten mit Alzheimer-Demenz, Patienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen und nicht-dementen Kontrollprobanden differenzieren zu können (Khan und Alkon, 2006).

Insgesamt bieten Zellen aus der Peripherie bei der Suche nach neuen Biomarkern neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere der Alzheimer-Demenz, viele Vorteile gegenüber der üblicherweise durchgeführten CSF-Analyse nach Lumbalpunktion. Sowohl die Entnahme von Fibroblasten, als auch von Blut, ist

weniger invasiv und kann auch unter Routinebedingungen durchgeführt werden. Des Weiteren sind sowohl aktivierte T-Zellen als auch Monozyten in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren und stellen damit den Bezug zur Peripherie her (Rodrigues und Granger, 2015). Außerdem kann ein Patient mit geringem Aufwand wiederholt über mehrere Jahre untersucht werden, was bei der Suche nach einem verlaufsorientierten Blut-Biomarker zur Diagnose von AD oder anderen Formen der Demenz vorteilhaft ist. In PBMCs konnten bereits verschiedene krankheitsassoziierte metabolische Veränderungen in Bezug auf AD nachgewiesen werden (Mandas und Dessi, 2014). Die genauen pathophysiologischen Hintergründe sind allerdings noch weitgehend unklar.

Bei den Probanden aus der hier vorgestellten Pilot-Studie zeigten sich im Vergleich zu den im Rahmen der Assay-Etablierung durchgeführten Experimenten vermehrt zusätzliche Signale in den Elektropherogrammen, die keiner der 8 identifizierten Isoformen zugeordnet werden konnten. Entsprechende Signale waren zwar in den Vorversuchen bereits beobachtet worden, jedoch in deutlich geringerer Ausprägung. Mögliche Ursachen für das vermehrte Auftreten dieser Signale könnten unter anderem das erhöhte Alter der Probanden in der klinischen Kohorte im Vergleich zu den Probanden der Assay-Etablierung sein, sowie krankheitsbedingte inflammatorische Reaktionen und medikamentöse Einflüsse, die auf die Verteilung der ERK1/2-Isoformen einwirken könnten. Auffällige Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen hinsichtlich dieser ERK1/2-Signale wurden nicht festgestellt. Ein weiterer Grund für das vermehrte Auftreten der unbekannt Signale könnte die verzögerte Weiterverarbeitung der EDTA-Vollblutproben gewesen sein, die in Ulm aus logistischen Gründen zum Teil mehrere Stunden betrug, während bei der Assay-Etablierung in Essen nach Blutentnahme eine direkte Weiterverarbeitung möglich war. Eine erste Analyse der unbekannt Signale mit spezifischen Antikörpern ermöglichte eine vorläufige Zuordnung, welcher zufolge es sich nicht um am TEY-Motiv phosphorylierte Isoformen handelte, da die anti-phospho-ERK1/2-Antikörper CS#4370 und CS#4377 dort keine Signale erzeugten. Aus diesem Grund wurden sie bei der weiteren Auswertung zur Kinetik der ERK1/2-Aktivierung nicht berücksichtigt. Bei den unbekannt Signalen mit pI 5,76 und pI 6,06 schien es sich um weitere ERK1-Varianten zu handeln, während das Signal mit pI 6,75 bei Immunfärbung höchstwahrscheinlich eine ERK2-Isoform darstellte. Die Zugehörigkeit des Signals mit pI 6,36 ließ sich nicht eindeutig bestimmen, da hier probandenabhängig entweder

der anti-ERK1- oder der anti-ERK2-Antikörper ein Signal erzeugte (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Aufklärung dieser Signale könnte gegebenenfalls zusätzliche Messparameter aufzeigen, die in zukünftige Experimente einbezogen werden könnten. Falls es sich um ein Artefakt durch z.B. Zwischenlagerung der Proben handelt, könnten diese Signale möglicherweise durch optimierte Versuchsabläufe reduziert werden.

Des Weiteren waren bei den einzelnen Probanden der Pilot-Studie im Vergleich zu den Probanden, die im Rahmen der Assay-Etablierung untersucht worden waren, auch Unterschiede in der Kinetik der ERK1/2-Phosphorylierung sichtbar. In den Proben aus Ulm zeigten vor allem die doppelt-phosphorylierten Isoformen von ERK1 und ERK2 eine deutlich geringere Abundanz. Insbesondere pp-ERK2 zeigte nahezu keinen zeitabhängigen Anstieg nach Stimulation der PBMCs mit NMDA in allen untersuchten diagnostischen Gruppen. Auch pp-ERK1 wies deutlich geringere relative Häufigkeiten in der klinischen Kohorte aus Ulm auf, sodass die Threonin-monophosphorylierten Isoformen von ERK1 und ERK2 unter diesen experimentellen Bedingungen den größten prozentualen Anteil aufwiesen. Diese Unterschiede im Vergleich zur Assay-Etablierung könnten möglicherweise ebenfalls altersbedingt sein oder aus den oben genannten, organisatorisch bedingten Unterschieden im experimentellen Ablauf resultieren. Sowohl pp-ERK1 als auch pT-ERK1 und pT-ERK2 zeigten eine zeitabhängige Aktivierungskinetik nach Stimulation der PBMCs mit NMDA und waren deshalb interessant für die weitere Auswertung.

Eine gezielte statistische Analyse ausgewählter und definierter Parameter sollte mögliche Unterschiede in der ERK1/2-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung in humanen PBMCs nach Zugabe von NMDA zwischen den diagnostischen Gruppen herausarbeiten. Für die Auswertungen wurde ein nicht-parametrisches Analyse-Verfahren verwendet (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Zweitest für multiple Vergleiche), da nicht davon ausgegangen werden konnte, dass diese Daten einer Normalverteilung unterlagen.

Der prozentuale Flächenanteil an der Summe der Flächen aller ERK1- bzw. ERK2-Signale jeder analysierten phospho-Isoform direkt vor NMDA-Zugabe ($t = 0$ min) zeigte keine auffälligen Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen.

Lediglich eine leichte Tendenz eines geringfügig niedrigeren Grundwertes für pp-ERK1 in der ND-Gruppe konnte beobachtet werden, wurde aber hauptsächlich durch die äußerst niedrigen Werte von zwei Probanden in dieser Gruppe ausgemacht. Hier ist zu beachten, dass die prozentualen Anteile der ERK1/2-phospho-Formen vor Beginn der Stimulation nur knapp über dem Hintergrundrauschen lagen und damit stärkerer Schwankung unterworfen waren. Kleinste Abweichungen in der Menge der fokussierten und an die Kapillarinne wand gebundenen Isoformen, sowie winzige Verunreinigungen innerhalb der Kapillare können somit bereits einen erheblichen Einfluss auf die Signalhöhe haben und könnten dementsprechend an der erhöhten Streuung beteiligt sein. Um verlässliche vergleichende Untersuchungen zum basalen Phosphorylierungsgrad von ERK1/2 in PBMCs durchführen zu können, wären dementsprechend weitere Optimierungen des Versuchsprotokolls, vor allem des Immunnachweises im CIEF-Immunoassay und eine größere Stichprobe nötig (s.u.).

Die maximale Zunahme der relativen Häufigkeit nach Zugabe von NMDA war für pp-ERK1 in der ND-Gruppe besonders stark ausgeprägt im Vergleich zur AD-Gruppe. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen erreichte statistische Signifikanz ($P < 0,05$ mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn's-Zweitest für multiple Vergleiche). Allerdings wiesen auch hier die Werte in der ND-Gruppe eine sehr deutliche Streuung auf, was auf die niedrigen Messwerte in zwei Probanden zum Zeitpunkt $t = 0$ min zurückzuführen war.

Vor allem nach Erreichen des Maximalwertes bei der anschließenden Dephosphorylierung zeigten sich messbare Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen. Die Isoformen pp-ERK1 und pT-ERK1 wiesen eine statistisch signifikant langsamere Dephosphorylierung in der AD-Gruppe verglichen mit der ND-Gruppe auf. Gleiches galt für den Vergleich von ALS mit ND für die beiden genannten Isoformen ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn's-Zweitest für multiple Vergleiche). Folglich schien bei den Patienten mit AD und ALS die Phosphorylierung dieser beiden Isoformen geringfügig länger zu persistieren, während sie sowohl in der ND-Gruppe als auch in der MCI-Gruppe etwas schneller wieder abnahm. Die beschriebenen statistischen Signifikanzen in Bezug auf die ERK1-Dephosphorylierung wurden nicht nur mit dem hier eingesetzten nicht-parametrischen Verfahren ermittelt, sondern konnten ebenso durch ein

parametrisches Analyseverfahren errechnet werden (one-way ANOVA gefolgt von Dunnett-Zweitest für multiple Vergleiche). Dabei waren sowohl der Vergleich von AD mit ND für die Isoformen pp-ERK1 und pT-ERK1 signifikant ($P < 0,01$), als auch der Vergleich von ALS mit ND für die Isoform pT-ERK1. Der Vergleich von ALS mit ND für pp-ERK1 stellte sich ebenfalls als signifikant heraus ($P < 0,05$). Die hier gezeigten Ergebnisse zur verlangsamten Dephosphorylierung von ERK1/2 in stimulierten PBMCs von AD-Patienten sind im Einklang mit entsprechenden Befunden an Fibroblasten (Zhao *et al.*, 2002) und unterstützen damit den Einsatz von peripheren Zellen für Biomarkerstudien und zur weiteren Untersuchung der Hintergründe verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen AD und MCI wurden nicht beobachtet. Hier ist aber nochmals hervorzuheben, dass die Stichprobe in der vorgelegten Pilot-Studie sehr klein war und die beschriebenen Beobachtungen damit als vorläufig zu betrachten sind.

Die verlangsamte ERK1/2-Dephosphorylierung nach Stimulation der PBMCs mit NMDA könnte auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Da keine offensichtlichen und statistisch signifikanten Unterschiede in der basalen Phosphorylierung, sowie in der absoluten maximalen Phosphorylierungsrate für die einzelnen ERK1/2-phospho-Formen zwischen den diagnostischen Gruppen nachgewiesen werden konnten, könnte die verlangsamte Inaktivierung durch eine dysfunktionelle Phosphataseaktivität hervorgerufen werden. Eine gestörte Aktivität der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) führte vermutlich auch in Fibroblasten von Patienten mit AD zu einer verlängerten ERK1-Aktivierung (Khan und Alkon, 2010). Insbesondere für PP2A wird postuliert, dass es sich um eine oxidativ sensitive Phosphatase handelt (Foley und Kintner, 2005), welche bei erhöhtem intrazellulärem oxidativen Stress bzw. dem Vorhandensein von reaktiven Sauerstoffspezies teilweise deaktiviert vorliegen könnte. Eine erhöhte Konzentration an ROS wiederum, könnte in PBMCs (Tuneva *et al.*, 2003), so wie in Neuronen, möglicherweise ebenfalls durch die vermutete durch Glutamat vermittelte Exzitotoxizität am NMDA-Rezeptor bei der Alzheimer-Demenz hervorgerufen werden (Kornhuber und Weller, 1997; Hinoi *et al.*, 2004) und würde auf diese Weise zu einer verlängerten ERK1/2-Aktivierung führen. Die Aktivität der PP2A könnte ebenso durch eine erhöhte Ausschüttung von spezifischen PP2A-Inhibitoren vermindert sein, wie sie im Gehirn von Patienten mit AD nachgewiesen werden konnte (Tanimukai *et al.*, 2005). Dadurch wird zusätzlich

in zweifacher Weise die Hyperphosphorylierung von Tau erhöht, da zum einen PP2A Tau direkt dephosphoryliert (Gong *et al.*, 1995) und zum anderen an der Inaktivierung verschiedener Tau-Kinasen, zu denen auch ERK1/2 gehören, beteiligt ist. Damit würde sich das Bild der Pathophysiologie der Alzheimer-Demenz vervollständigen (Liu und Gotz, 2013). Allerdings bleibt hierbei offen, ob eine derart hervorgerufene Dysregulation von PP2A bei AD auch in peripheren Zellen erfolgt.

Zusammenfassend kann auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse und Beobachtungen ein hypothetischer Verlauf des zeitlichen Auftretens am Beispiel der doppelt-phosphorylierten, vollständig aktivierten Isoform pp-ERK1 in PBMCs von AD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe erstellt werden (Abbildung 19). Danach könnte, ausgehend von einem geringfügig höheren initialen Phosphorylierungszustand in den PBMCs von an AD erkrankten Patienten, eine verminderte relative Zunahme an pp-ERK1 nach Stimulation erfolgen, sowie eine nachfolgende verlangsamte Inaktivierung durch Phosphatasen.

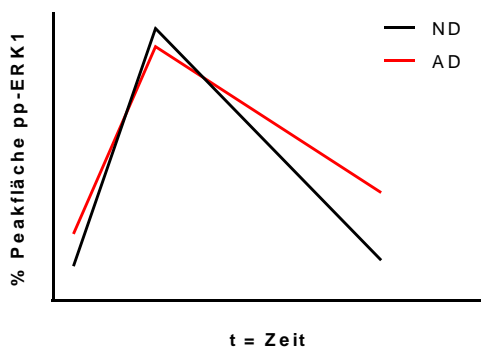


Abbildung 19: hypothetischer Verlauf des NMDA-stimulierten Auftretens von pp-ERK1 in humanen PBMCs.

Gezeigt sind die Mittelwerte für die Isoform pp-ERK1 der diagnostischen Gruppen ND und AD ohne Fehlerbalken für die drei in Abbildung 18 analysierten Parameter in schematischer Form.

Für zukünftige Experimente und zur Anwendung der vorgestellten Methode mit einer größeren klinischen Kohorte sollten zunächst verschiedene Parameter weiterhin optimiert werden. Das bisher benötigte Volumen von ca. 40 ml Vollblut sollte reduziert werden, um einige, gezielt ausgewählte Zeitpunkte in der ERK1/2-Phosphorylierung nach Stimulation der PBMCs mit NMDA zu untersuchen (z.B. Grundwert, Maximum und $t = 15$ min). Da jedoch das Aktivierungsmaximum nicht bei allen Probanden zum gleichen Zeitpunkt erreicht wurde, bedarf es an diesem Punkt einer Klärung, ob zu diesem Zweck ggf. auch ein einzelner Zeitpunkt bei etwa $t = 4$ min für alle Probanden verwendet werden könnte. Weiterhin erschwert die beobachtete geringe Abundanz der meisten ERK1/2-phospho-Formen die

quantitative bzw. semi-quantitative Analyse. Eine Erhöhung der Belichtungszeit oder der Einsatz eines Streptavidin-Biotin-Verstärkerschrittes würde diese Signale eventuell in einem entsprechenden Maße erhöhen, allerdings könnten sie auch zu einer Überbelichtung der unphosphorylierten Signale von ERK1 und ERK2 führen. Je nach Fragestellung wären dann unter Umständen Anpassungen in der primären Datenanalyse notwendig. Alternativ könnte ein anti-phospho-ERK1/2-Antikörper eingesetzt werden, welcher alle ERK1/2-phospho-Formen detektiert. Die hier verwendeten Antikörper erkannten allerdings entweder pY-phosphorylierte oder pT-phosphorylierte ERK-Isoformen, unabhängig vom Phosphorylierungsstatus des anderen Aminosäurerestes im TEY-Motiv, sodass ein für den CIEF-Immunoassay geeigneter allgemeiner anti-phospho-ERK1/2-Antikörper zunächst identifiziert werden müsste. Ein wichtiger Aspekt bei der Planung und Vorbereitung einer erweiterten Studie ist der erforderliche hohe koordinatorische und zeitliche Aufwand, vor allem in Bezug auf die Absprache zwischen Blutabnahme in der Klinik und möglichst direkter Verarbeitung im Labor. Da möglicherweise eine verlängerte Zwischenlagerung zur Entstehung der beschriebenen zusätzlichen, unbekanntenen Signale führte, sollte weiterhin auch eine Klärung dieser unbekanntenen Peaks erfolgen.

5 Zusammenfassung

Fehlregulationen der ERK1/2-Signalkaskade könnten nicht nur in der Onkogenese, sondern auch im Kontext der Alzheimer-Krankheit und der Amyotrophen Lateralsklerose involviert sein (Kim und Choi, 2010; Deschenes-Simard *et al.*, 2014). Vollständig aktiviert werden die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1 und ERK2 über eine doppelte Phosphorylierung an einem konservierten Threonin-Glutamat-Tyrosin (TEY)-Motiv. Monophosphorylierte Isoformen von ERK1/2 sind ebenfalls in lebenden Zellen nachzuweisen und besitzen *in vitro* bei physiologischen ATP-Konzentrationen eine messbare Kinaseaktivität. Eine hochauflösende Trennung und Detektion der unphosphorylierten, einfach- und zweifach-phosphorylierten Isoformen von ERK1 und ERK2 sowie ihre semi-quantitative Analyse sind durch den Einsatz der isoelektrischen Fokussierung in Mikrokapillaren mit nachgeschaltetem Immunnachweis (CIEF-Immunoassay) möglich.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein optimiertes Arbeitsprotokoll entwickelt, um die Phosphorylierung von ERK1/2 in Zelllysaten mit dem CIEF-Immunoassay zu analysieren. Es wurden verschiedene Lysesysteme getestet, wobei sich herausstellte, dass Reduktionsmittel die ERK1/2-Detektion erheblich beeinflussen können. Das kommerziell erhältliche M-PER-Reagenz eignete sich am besten, da es eine höhere Effizienz zur Lyse der Zellkerne zeigte als andere Lysepuffer, keine Reduktionsmittel enthielt und eine hohe Ausbeute an phosphorylierten ERK1/2-Isoformen ermöglichte. Die Reproduzierbarkeit der relativen Quantifizierungen im CIEF-Immunoassay erwies sich für solche Signale als akzeptabel (Variationskoeffizient < 15 %), deren relativer Flächeninhalt mindestens 1 % der aufsummierten Flächeninhalte aller ERK1- bzw. ERK2-Signale betrug. Insgesamt lagen die Abweichungen in einem Bereich, der in der Regel sowohl einen Vergleich von Proben innerhalb eines Laufes als auch zwischen mehreren Läufen erlaubte.

Als wichtige Weiterentwicklung der bisher publizierten analytischen Möglichkeiten des verwendeten CIEF-Immunoassays gelang im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit die zusätzliche Unterscheidung und eindeutige Zuordnung von Threonin-monophosphoryliertem und Tyrosin-monophosphoryliertem ERK1 und ERK2. Dieser Nachweis wurde durch die Kombination synthetischer phospho-ERK1/2-Peptide mit verschiedenen anti-phospho-ERK1/2-Antikörpern in kompetitiven

Blockierungsexperimenten, welche in dieser Form erstmalig im CIEF-Immunoassay eingesetzt wurden, erreicht.

Um die praktische Anwendbarkeit des optimierten Arbeits- und Analyseprotokolls zu überprüfen, wurde im zweiten Teil der Arbeit zunächst exemplarisch die Kinetik der ERK1/2-Phosphorylierung in den Zelllinien SH-SY5Y und THP-1 sowie in humanen peripheren mononukleären Blutzellen nach Stimulation der Zellen zeitabhängig untersucht. Die ERK1/2-phospho-Form-Verteilung schien dabei abhängig vom jeweiligen Zelltyp und eingesetzten Aktivator zu variieren.

Die erfolgreich etablierte Methode wurde schließlich in Form einer orientierenden Pilot-Studie mit einer klinischen Kohorte an humanen peripheren mononukleären Blutzellen von Patienten mit Alzheimer-Demenz, leichten kognitiven Einschränkungen, Amyotropher Lateralsklerose und nicht-dementen Kontrollprobanden angewandt. Trotz der sehr kleinen Stichprobe konnten statistisch signifikante Gruppenunterschiede, nach erfolgter Aktivierung durch Gabe eines Stimulus, hinsichtlich der Inaktivierung (Dephosphorylierung) der doppel-phosphorylierten und Threonin-monophosphorylierten Formen von ERK1 beobachtet werden. Dies könnte auf eine mögliche krankheitsassoziierte Veränderung in der Aktivität von Phosphatasen hinweisen. Die Ergebnisse sind allerdings aufgrund der kleinen Gruppengrößen als vorläufig zu betrachten. Für den Einsatz mit einer größeren Kohorte ist die Optimierung weiterer Parameter erforderlich. Insgesamt ermöglicht der CIEF-Immunoassay eine detaillierte Studie zur relativen Verteilung der phospho-ERK1/2-Isoformen in Zelllysaten.

6 Ausblick

Die hier präsentierten Daten können als methodologische Basis für zukünftige und weiterführende Studien zur spezifischen, Stimulus-abhängigen ERK1/2-Phosphorylierungs-Kinetik im Rahmen der Biomarker-Forschung, aber auch der grundlagenorientierten Forschung dienen. Die simultane relative Quantifizierung verschiedener phosphorylierter Formen der ERK1/2 MAP Kinasen und insbesondere die hier aufgezeigte, neue Möglichkeit, Threonin- und Tyrosin-monophosphorylierte Formen von ERK1/2 zu differenzieren, könnte langfristig zu einem vertieften und verbesserten Verständnis der zellulären Regulation der ERK1/2-Aktivität unter physiologischen und pathophysiologischen Gegebenheiten sowie der biologischen Rolle der monophosphorylierten Formen dieser Kinasen beitragen.

Eine Anwendung der Technologie auf transgene Tiermodelle der Amyloid- und Taupathologie der Alzheimer-Krankheit sowie auf geeignete Zellkulturmodelle erscheint hier besonders attraktiv. Für zukünftige Studien zur Kinetik der ERK1/2-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung in humanen PBMCs sollte im Vorfeld vorrangig die Herkunft der unbekanntenen Signale aufgeklärt werden und das benötigte Blutvolumen reduziert werden. Nach Optimierung dieser und anderer, in Abschnitt 4.4 genannter Parameter, könnte daraufhin gezielt untersucht werden, ob sich die hier vorgestellten Beobachtungen zu möglichen krankheitsassoziierten Veränderungen in der Aktivität von Phosphatasen in der Peripherie anhand einer größeren Stichprobe bestätigen lassen.

Der vorgestellte CIEF-Immunoassay und das etablierte Protokoll zur zeitabhängigen Zellstimulation sind darüber hinaus auch für die Anwendung auf andere, verwandte MAP Kinasen wie p38 und JNK hochinteressant. Diese Stress-aktivierten Proteinkinasen spielen eine wichtige Rolle bei neuroinflammatorischen Prozessen und stehen deshalb möglicherweise u.a. auch mit der Pathophysiologie der Alzheimer-Demenz in Verbindung (Kyriakis und Avruch, 2001). Ausgehend von ersten, vielversprechenden Beobachtungen mit zwei verschiedenen anti-phospho-p38-Antikörpern in unserem Labor müssten im nächsten Schritt zunächst geeignete pan-spezifische Antikörper identifiziert und die spezifischen experimentellen Protokolle etabliert und optimiert werden.

7 Literaturverzeichnis

- Adams, J. P., Roberson, E. D., English, J. D., Selcher, J. C., & Sweatt, J. D. (2000). MAPK regulation of gene expression in the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, *60*(3), 377-394.
- Alessi, D. R., Gomez, N., Moorhead, G., Lewis, T., Keyse, S. M., & Cohen, P. (1995). Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr Biol*, *5*(3), 283-295.
- Asimaki, O., & Mangoura, D. (2011). Cannabinoid receptor 1 induces a biphasic ERK activation via multiprotein signaling complex formation of proximal kinases PKCepsilon, Src, and Fyn in primary neurons. *Neurochem Int*, *58*(2), 135-144. doi:10.1016/j.neuint.2010.11.002
- Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., & Freedman, L. S. (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*, *38*(11 Pt 1), 3751-3757.
- Bockmann, S., & Paegelow, I. (2000). Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *J Leukoc Biol*, *68*(5), 587-592.
- Boutahar, N., Reynaud, E., Lassabliere, F., & Borg, J. (2008). Timing differences of signaling response in neuron cultures activated by glutamate analogue or free radicals. *Brain Res*, *1191*, 20-29. doi:10.1016/j.brainres.2007.11.016
- Burack, W. R., & Sturgill, T. W. (1997). The activating dual phosphorylation of MAPK by MEK is nonprocessive. *Biochemistry*, *36*(20), 5929-5933. doi:10.1021/bi970535d
- Cha, H., & Shapiro, P. (2001). Tyrosine-phosphorylated extracellular signal-regulated kinase associates with the Golgi complex during G2/M phase of the cell cycle: evidence for regulation of Golgi structure. *J Cell Biol*, *153*(7), 1355-1367.
- Chen, J. Q., Lee, J. H., Herrmann, M. A., Park, K. S., Heldman, M. R., Goldsmith, P. K., Wang, Y., & Giaccone, G. (2013). Capillary isoelectric-focusing immunoassays to study dynamic oncoprotein phosphorylation and drug response to targeted therapies in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther*, *12*(11), 2601-2613. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0074
- Chen, R. H., Sarnecki, C., & Blenis, J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol*, *12*(3), 915-927.
- Cheung, E. C., & Slack, R. S. (2004). Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. *Sci STKE*, *2004*(251), PE45. doi:10.1126/stke.2512004pe45
- Chung, Y. H., Joo, K. M., Lim, H. C., Cho, M. H., Kim, D., Lee, W. B., & Cha, C. I. (2005). Immunohistochemical study on the distribution of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (ERK) in the central nervous system of SOD1G93A transgenic mice. *Brain Res*, *1050*(1-2), 203-209. doi:10.1016/j.brainres.2005.05.060
- Cobb, M. H., & Goldsmith, E. J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem*, *270*(25), 14843-14846.
- Deschenes-Simard, X., Kottakis, F., Meloche, S., & Ferbeyre, G. (2014). ERKs in cancer: friends or foes? *Cancer Res*, *74*(2), 412-419. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2381
- Desdouits-Magnen, J., Desdouits, F., Takeda, S., Syu, L. J., Saltiel, A. R., Buxbaum, J. D., Czernik, A. J., Nairn, A. C., & Greengard, P. (1998). Regulation of

- secretion of Alzheimer amyloid precursor protein by the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Neurochem*, 70(2), 524-530.
- Dubois, P. M., Palmer, D., Webb, M. L., Ledbetter, J. A., & Shapiro, R. A. (1996). Early signal transduction by the receptor to the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 in a murine T cell hybrid. *J Immunol*, 156(4), 1356-1361.
- Ellis, E. F., Chao, J., & Heizer, M. L. (1989). Brain kininogen following experimental brain injury: evidence for a secondary event. *J Neurosurg*, 71(3), 437-442. doi:10.3171/jns.1989.71.3.0437
- Ferrell, J. E., Jr., & Bhatt, R. R. (1997). Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 272(30), 19008-19016.
- Foley, T. D., Armstrong, J. J., & Kupchak, B. R. (2004). Identification and H₂O₂ sensitivity of the major constitutive MAPK phosphatase from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 315(3), 568-574. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.096
- Foley, T. D., & Kintner, M. E. (2005). Brain PP2A is modified by thiol-disulfide exchange and intermolecular disulfide formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 330(4), 1224-1229. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.108
- Gong, C. X., Shaikh, S., Wang, J. Z., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1995). Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem*, 65(2), 732-738.
- Grewal, S. S., York, R. D., & Stork, P. J. (1999). Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 9(5), 544-553. doi:10.1016/S0959-4388(99)00010-0
- Gribble, F. M., Loussouarn, G., Tucker, S. J., Zhao, C., Nichols, C. G., & Ashcroft, F. M. (2000). A novel method for measurement of submembrane ATP concentration. *J Biol Chem*, 275(39), 30046-30049. doi:10.1074/jbc.M001010200
- Hill, C. S., & Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*, 80(2), 199-211.
- Hill, H. D., & Straka, J. G. (1988). Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Anal Biochem*, 170(1), 203-208.
- Hinoi, E., Takarada, T., Ueshima, T., Tsuchihashi, Y., & Yoneda, Y. (2004). Glutamate signaling in peripheral tissues. *Eur J Biochem*, 271(1), 1-13.
- Hubbard, M. A., Khalil, A. A., Schoeff, S. S., Allak, A., VanKoeveering, K. K., Maxwell, A. K., Adejumo, O., Mendez, R. E., & Jameson, M. J. (2014). Nanoimmunoassay to Detect Responses in Head and Neck Cancer: Feasibility in a Mouse Model. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 151(1), 92-99. doi:10.1177/0194599814528302
- Jimenez-Sainz, M. C., Fast, B., Mayor, F., Jr., & Aragay, A. M. (2003). Signaling pathways for monocyte chemoattractant protein 1-mediated extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol Pharmacol*, 64(3), 773-782. doi:10.1124/mol.64.3.773
- Johlf, M. G., Gorjala, P., Urasaki, Y., Le, T. T., & Fiscus, R. R. (2015). Capillary Isoelectric Focusing Immunoassay for Fat Cell Differentiation Proteomics. *PLoS One*, 10(7), e0132105. doi:10.1371/journal.pone.0132105
- Kamiya, T., Katayama, Y., Kashiwagi, F., & Terashi, A. (1993). The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. *Stroke*, 24(4), 571-575; discussion 575-576.
- Khan, T. K., & Alkon, D. L. (2006). An internally controlled peripheral biomarker for Alzheimer's disease: Erk1 and Erk2 responses to the inflammatory signal

- bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(35), 13203-13207. doi:10.1073/pnas.0605411103
- Khan, T. K., & Alkon, D. L. (2010). Early diagnostic accuracy and pathophysiologic relevance of an autopsy-confirmed Alzheimer's disease peripheral biomarker. *Neurobiol Aging*, 31(6), 889-900. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.010
- Kim, E. K., & Choi, E. J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1802(4), 396-405. doi:10.1016/j.bbadis.2009.12.009
- Kinoshita, T., Yoshida, I., Nakae, S., Okita, K., Gouda, M., Matsubara, M., Yokota, K., Ishiguro, H., & Tada, T. (2008). Crystal structure of human mono-phosphorylated ERK1 at Tyr204. *Biochem Biophys Res Commun*, 377(4), 1123-1127. doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.127
- Kornhuber, J., & Weller, M. (1997). Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. *Biol Psychiatry*, 41(2), 135-144. doi:10.1016/S0006-3223(96)00047-9
- Kraus, I., Besong Agbo, D., Otto, M., Wiltfang, J., & Klafki, H. (2015). Detection and Differentiation of Threonine- and Tyrosine-Monophosphorylated Forms of ERK1/2 by Capillary Isoelectric Focusing-Immunoassay. *Sci Rep*, 5, 12767. doi:10.1038/srep12767
- Kyriakis, J. M., & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 81(2), 807-869.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Li, L., Wysk, M., Gonzalez, F. A., & Davis, R. J. (1994). Genomic loci of human mitogen-activated protein kinases. *Oncogene*, 9(2), 647-649.
- Liu, C., & Gotz, J. (2013). How it all started: tau and protein phosphatase 2A. *J Alzheimers Dis*, 37(3), 483-494. doi:10.3233/JAD-130503
- Lombardi, G., Dianzani, C., Miglio, G., Canonico, P. L., & Fantozzi, R. (2001). Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes. *Br J Pharmacol*, 133(6), 936-944. doi:10.1038/sj.bjp.0704134
- Mandas, A., & Dessi, S. (2014). Mononuclear cells in dementia. *Clin Chim Acta*, 431, 278-287. doi:10.1016/j.cca.2014.02.016
- O'Neill, R. A., Bhamidipati, A., Bi, X., Deb-Basu, D., Cahill, L., Ferrante, J., Gentalen, E., Glazer, M., Gossett, J., Hacker, K., Kirby, C., Knittle, J., Loder, R., Mastroieni, C., Maclaren, M., Mills, T., Nguyen, U., Parker, N., Rice, A., Roach, D., Suich, D., Voehringer, D., Voss, K., Yang, J., Yang, T., & Vander Horn, P. B. (2006). Isoelectric focusing technology quantifies protein signaling in 25 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(44), 16153-16158. doi:10.1073/pnas.0607973103
- Parsons, Z. D., & Gates, K. S. (2013). Thiol-dependent recovery of catalytic activity from oxidized protein tyrosine phosphatases. *Biochemistry*, 52(37), 6412-6423. doi:10.1021/bi400451m
- Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Weber, M. J., & Sturgill, T. W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J*, 10(4), 885-892.
- Pei, J. J., Braak, H., An, W. L., Winblad, B., Cowburn, R. F., Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. (2002). Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res*, 109(1-2), 45-55.

- Perry, G., Roder, H., Nunomura, A., Takeda, A., Friedlich, A. L., Zhu, X., Raina, A. K., Holbrook, N., Siedlak, S. L., Harris, P. L., & Smith, M. A. (1999). Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation. *Neuroreport*, *10*(11), 2411-2415.
- Prabakaran, S., Everley, R. A., Landrieu, I., Wieruszeski, J. M., Lippens, G., Steen, H., & Gunawardena, J. (2011). Comparative analysis of Erk phosphorylation suggests a mixed strategy for measuring phospho-form distributions. *Mol Syst Biol*, *7*, 482. doi:10.1038/msb.2011.15
- Ramos, J. W. (2008). The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*, *40*(12), 2707-2719. doi:10.1016/j.biocel.2008.04.009
- Regoli, D., Jukic, D., Gobeil, F., & Rhaleb, N. E. (1993). Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis. *Can J Physiol Pharmacol*, *71*(8), 556-567.
- Rodrigues, S. F., & Granger, D. N. (2015). Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers*, *3*(1-2), e978720. doi:10.4161/21688370.2014.978720
- Roskoski, R., Jr. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*, *66*(2), 105-143. doi:10.1016/j.phrs.2012.04.005
- Saxena, M., Williams, S., Brockdorff, J., Gilman, J., & Mustelin, T. (1999). Inhibition of T cell signaling by mitogen-activated protein kinase-targeted hematopoietic tyrosine phosphatase (HePTP). *J Biol Chem*, *274*(17), 11693-11700.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, *150*(1), 76-85.
- Sohaskey, M. L., & Ferrell, J. E., Jr. (1999). Distinct, constitutively active MAPK phosphatases function in *Xenopus* oocytes: implications for p42 MAPK regulation *In vivo*. *Mol Biol Cell*, *10*(11), 3729-3743.
- Spitzer, P., Schieb, H., Kamrowski-Kruck, H., Otto, M., Chiasserini, D., Parnetti, L., Herukka, S. K., Schuchhardt, J., Wiltfang, J., & Klafki, H. W. (2011). Evidence for Elevated Cerebrospinal Fluid ERK1/2 Levels in Alzheimer Dementia. *Int J Alzheimers Dis*, *2011*, 739847. doi:10.4061/2011/739847
- Sweatt, J. D. (2001). The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem*, *76*(1), 1-10.
- Tanimukai, H., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2005). Up-regulation of inhibitors of protein phosphatase-2A in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, *166*(6), 1761-1771. doi:10.1016/S0002-9440(10)62486-8
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *76*(9), 4350-4354.
- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*, *8*(2), 205-215.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, *26*(2), 171-176.
- Tuneva, E. O., Bychkova, O. N., & Boldyrev, A. A. (2003). Effect of NMDA on production of reactive oxygen species by human lymphocytes. *Bull Exp Biol Med*, *136*(2), 159-161.
- Wolf, I., & Seger, R. (2002). The mitogen-activated protein kinase signaling cascade: from bench to bedside. *Isr Med Assoc J*, *4*(8), 641-647.

- Yao, Z., Dolginov, Y., Hanoch, T., Yung, Y., Ridner, G., Lando, Z., Zharhary, D., & Seger, R. (2000). Detection of partially phosphorylated forms of ERK by monoclonal antibodies reveals spatial regulation of ERK activity by phosphatases. *FEBS Lett*, *468*(1), 37-42.
- Zhao, W. Q., Ravindranath, L., Mohamed, A. S., Zohar, O., Chen, G. H., Lyketsos, C. G., Etcheberrigaray, R., & Alkon, D. L. (2002). MAP kinase signaling cascade dysfunction specific to Alzheimer's disease in fibroblasts. *Neurobiol Dis*, *11*(1), 166-183.
- Zhou, B., Wang, Z. X., Zhao, Y., Brautigan, D. L., & Zhang, Z. Y. (2002). The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases. *J Biol Chem*, *277*(35), 31818-31825. doi:10.1074/jbc.M203969200
- Zhou, B., & Zhang, Z. Y. (2002). The activity of the extracellular signal-regulated kinase 2 is regulated by differential phosphorylation in the activation loop. *J Biol Chem*, *277*(16), 13889-13899. doi:10.1074/jbc.M200377200

8 Publikationen

Hanelt, I., Wunnicke, D., Muller-Trimbusch, M., Vor der Bruggen, M., Kraus, I., Bakker, E. P., & Steinhoff, H. J. (2010).

Membrane region M2C2 in subunit KtrB of the K⁺ uptake system KtrAB from *Vibrio alginolyticus* forms a flexible gate controlling K⁺ flux: an electron paramagnetic resonance study. *J Biol Chem*, 285(36), 28210-28219. doi: 10.1074/jbc.M110.139311

Kraus, I., Besong Agbo, D., Otto, M., Wiltfang, J., & Klafki, H. (2015).

Detection and Differentiation of Threonine- and Tyrosine-Monophosphorylated Forms of ERK1/2 by Capillary Isoelectric Focusing-Immunoassay. *Sci Rep*, 5, 12767. doi:10.1038/srep12767

Posterausstellungen

Kraus, I., Genius, J., Klafki, H., Wiltfang, J.

Capillary IEF for analyzing the MAP kinase phosphorylation patterns in an in vitro model for microglial inflammation response. *Poster-Präsentation auf der 57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie (DGNN) 2012 in Erlangen, Deutschland.*

Kraus, I., Besong Agbo, D., Klafki, H., Wiltfang, J.

Detection of monophosphorylated ERK-species in monocytic and neuronal cellular models via a capillary-based Nanoimmunoassay. *Poster-Präsentation auf der 11th International Conference On Alzheimer's & Parkinson's Disease (AD/PD™) 2013 in Florenz, Italien.*

Kraus, I., Besong Agbo, D., Klafki, H., Wiltfang, J.

Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von mono- und diphosphorylierten Formen der MAP Kinasen ERK1 und ERK2 in SH-SY5Y und THP-1 Zellen. *Poster-Präsentation auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN) 2013 in Berlin, Deutschland.*

Kraus, I., Besong Agbo, D., Klafki, H., Wiltfang, J.

Differentiation of Threonine- and Tyrosine-monophosphorylated ERK Isoforms in Specific Cell Lines and Human PBMCs. *Poster-Präsentation auf dem European Simple Western User Meeting 2014 in Paris, Frankreich.*

Kraus, I., Besong Agbo, D., Otto, M., Klafki, H., Wiltfang, J.

Measurement of ERK1/2 Isoform Distribution in Peripheral Blood Mononuclear Cells Derived from Whole Blood from Patients with different Neuropsychiatric Disorders. *Poster-Präsentation auf dem 29. Symposium der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP) in München, Deutschland.*

Danksagungen

Großer Dank geht an Prof. J. Wiltfang für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Betreuung meiner Arbeit sowie in besonderem Maße für die Unterstützung nach dem Standortwechsel des Labors.

Bei Prof. M. Otto möchte ich mich ganz besonders für die Kooperation und die Rekrutierung der Probanden aus der Pilot-Studie an humanen PBMCs bedanken sowie für die Möglichkeit die Experimente zu diesem Projekt-Teil in seinem Labor am Universitätsklinikum Ulm durchführen zu können. In diesem Zuge möchte ich mich ebenso für die tatkräftige Unterstützung im Labor in Ulm durch S. Meier und S. Halbgebauer bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Dr. H. Klafki für die tatkräftige Unterstützung und intensive Betreuung, sowie für viele interessante Denkanstöße und Diskussionen.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Dr. D. Besong Agbo für die Betreuung im Essener Labor, die Einarbeitung in die Methoden und für die persönliche Unterstützung vor und während des Laborumzugs.

Mein allerherzlichster Dank geht an alle Kollegen des ehemaligen Labors für Molekulare Neurobiologie in Essen. Danke an D. Besong Agbo, H. Esselmann, J. Genius, S. Glumm, C. Hafermann (ehemals Janßen), H. Hafermann, U. Haußmann, H. Kamrowski-Kruck, H. Klafki, R. Schnitzler sowie an S. Hagemann und B. Gröttrup. Es war eine schöne Zeit mit euch.

Ich bedanke mich herzlich bei meinen Eltern und meinem Lebensgefährten, die auch in schwierigen Phasen immer für mich da waren.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Etablierung und Weiterentwicklung einer Methode zur hochauflösenden Untersuchung des Phosphorylierungszustandes der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1 und ERK2“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Inga Kraus befürworte.

Göttingen, den _____

Name des wissenschaftl.
Betreuers

Unterschrift d. wissenschaftl.
Betreuers

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Göttingen, den _____

Unterschrift Inga Kraus

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Göttingen, den _____

Unterschrift Inga Kraus